

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 112**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/085 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2005** **E 11185020 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019** **EP 2455400**

54 Título: **Péptidos de fijación a la poli-N-acetil glucosamina (PNAG/dPNAG) y procedimientos para el uso de los mismos**

30 Prioridad:

21.04.2004 US 564105 P

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

20.01.2020

73 Titular/es:

THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.

(50.0%)

75 Francis Street

Boston, MA 02115, US y

BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER,

INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

PIER, GERALD B;

KELLY-QUINTOS, CASIE ANNE;

CAVACINI, LISA y

POSNER, MARSHALL R

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 738 112 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

Péptidos de fijación a la poli-N-acetil glucosamina (PNAG/dPNAG) y procedimientos para el uso de los mismos

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere de forma general a los péptidos que se fijan a la poli-N-acetil glucosamina (PNAG) y a la PNAG desacetilada (dPNAG) de bacterias tales como *Staphylococcus*, y su uso en el diagnóstico y el tratamiento de infecciones por estafilococos y otras infecciones por bacterias que expresan la PNAG.

Antecedentes de la invención

10 Maira-Litran T et al: "Immunochemical Properties of the Staphylococcal Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide", *Infection and Immunity*, American Society for Microbiology, US, vol. 70, N° 8, agosto de 2002, páginas 4433-4440. Maira-Litran T et al: "Biologic properties and vaccine potential of the staphylococcal poly-N-acetyl glucosamine surface polysaccharide", *Vaccine*, Butterworth Scientific, GB, vol. 22, N° 7, 17 de febrero de 2004, páginas 872-879.

15 Los estafilococos son bacterias grampositivas que normalmente habitan y colonizan la piel y las membranas mucosas de los humanos. Si la piel o la membrana mucosa se daña durante una intervención quirúrgica u otro traumatismo, los estafilococos consiguen alcanzar los tejidos internos y provocan la aparición de infecciones. Si los estafilococos proliferan localmente o entran en el sistema linfático o el torrente circulatorio, podrían producirse complicaciones infecciosas graves tales como las asociadas a la bacteriemia por estafilococos. Las complicaciones asociadas a la bacteriemia por estafilococos incluyen el choque séptico, endocarditis, artritis, osteomielitis, neumonía y abscesos en diferentes órganos.

20 Los estafilococos incluyen tanto organismos coagulasa positivos que producen una coagulasa libre, como organismos coagulasa negativos que no producen esta coagulasa libre. *Staphylococcus aureus* es la forma más frecuente de estafilococo coagulasa positivo. *S. aureus* suele provocar la infección en un foco localizado, bien extravascular o intravascular, que finalmente podría acabar provocando una bacteriemia. *S. aureus* es también la principal causa de osteomielitis aguda y ocasiona infecciones de neumonía por estafilococos. Adicionalmente, *S. aureus* es responsable de aproximadamente el 1-9% de los casos de meningitis bacteriana y del 10 al 15% de los abscesos cerebrales.

30 Hay al menos 21 especies conocidas de estafilococos que no expresan la coagulasa, entre ellos, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. simulans* y *S. capitis*. *S. epidermidis* es el que con más frecuencia provoca las infecciones asociadas a los dispositivos de acceso intravenoso y es el aislado más frecuente en las bacteriemias intrahospitalarias primarias. *S. epidermidis* también está asociado a la endocarditis por válvula protésica.

35 Los estafilococos son también una fuente habitual de infecciones bacterianas en los animales. Por ejemplo, la mastitis estafilocócica es un problema frecuente en los rumiantes entre ellos vacas, ovejas y cabras. La enfermedad se suele tratar con antibióticos para reducir la infección, pero el tratamiento es un procedimiento costoso y además tiene por consecuencia una pérdida de producción de leche. Las vacunas más eficaces para el ganado que se han identificado hasta la fecha son las vacunas con *S. aureus* intacto y vivo administradas por vía subcutánea. La administración de las vacunas vivas, no obstante, lleva asociado el riesgo de infección y de reacciones de toxicidad. Por este motivo, muchos investigadores han intentado producir vacunas de *S. aureus* muertos y/o aislar los polisacáridos capsulares o los componentes de la pared celular que inducirán la inmunidad frente a *S. aureus*. Sin embargo, ninguno de estos intentos ha tenido éxito.

Compendio de la invención

45 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La descripción se refiere de forma general a la identificación y el uso de péptidos que se fijan a la poli-N-acetil glucosamina (PNAG) tal como la poli-N-acetil glucosamina (PNAG) estafilocócica y la PNAG poco acetilada o desacetilada (que de forma colectiva se denominan dPNAG en la presente memoria). Estos péptidos se denominan en la presente memoria péptidos de fijación a la PNAG/dPNAG. Los ejemplos de dichos péptidos incluyen los que tienen secuencias de aminoácidos derivadas de regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) o regiones variables de los anticuerpos descritos en el presente documento o producidos a partir de híbridos depositados en la ATCC el 21 de abril de 2004, con los N° de acceso PTA-5931 (F598), PTA-5932 (F628) y PTA-5933 (F630). Estos péptidos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos, anticuerpos monoclonales (tales como anticuerpos monoclonales humanos) y fragmentos de anticuerpo. Una peculiaridad común de los péptidos descritos en la presente memoria es su capacidad para reconocer y fijarse a la PNAG y/o dPNAG estafilocócica de forma específica. Los péptidos de la invención también puede reconocer y fijarse a la PNAG y/o a la dPNAG expresada por otras cepas bacterianas. Una característica importante de algunos de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo proporcionados por la invención es su capacidad para mejorar la opsonización y la fagocitosis (a saber, opsonofagocitosis) de las cepas bacterianas, tales como las especies estafilocócicas, que expresan la PNAG.

Así, en un aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un péptido aislado que se fija selectivamente a la poli-N-acetil glucosamina estafilocócica (PNAG/dPNAG) y comprende una secuencia de aminoácidos de una CDR de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica, o su variante funcionalmente equivalente.

5 En una realización, la CDR de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica es una CDR3 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica. La CDR3 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica puede comprender una secuencia de aminoácidos de una CDR3 de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 21, o puede comprender una secuencia de aminoácidos de una CDR3 de la cadena pesada procedente de un hibridoma depositado que tiene un N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 o PTA-5933 en la ATCC. La CDR3 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica puede comprender una secuencia de aminoácidos de
10 una CDR3 de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 24 o puede comprender una secuencia de aminoácidos de una CDR3 de la cadena ligera procedente de un hibridoma depositado que tiene el N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 o PTA-5933 en la ATCC.

15 En otra realización, la CDR de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica es una CDR2 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica. La CDR2 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 23 o puede comprender una secuencia de aminoácidos de una CDR2 procedente de un hibridoma depositado que tiene el N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 o PTA-5933 en la ATCC.

20 En otra realización, la CDR de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica es una CDR1 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica. La CDR1 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 22 o puede comprender una secuencia de aminoácidos de una CDR1 procedente de un hibridoma depositado que tiene el N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 o PTA-5933 en la ATCC.

25 En una realización, el péptido aislado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada procedente de un hibridoma depositado que tiene el N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 o PTA-5933 en la ATCC.

30 En otra realización, el péptido aislado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6 o una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera procedente de un hibridoma depositado que tiene el N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 o PTA-5933 en la ATCC.

35 En una realización, el péptido aislado es un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, aislado tal como, pero sin limitarse a él, un anticuerpo monoclonal aislado, preferiblemente soluble, intacto o un fragmento de anticuerpo monoclonal aislado tal como, pero sin limitarse a ellos, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd y un fragmento Fab. El anticuerpo aislado puede ser un anticuerpo producido desde un hibridoma depositado que tiene el N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 o PTA-5933 en la ATCC o un fragmento de anticuerpo del mismo.

40 En una realización, el anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, aislado mejora la opsonofagocitosis de las cepas bacterianas que expresan la PNAG (p. ej., estafilococos tales como, pero sin limitarse a ellos, *S. aureus* o *S. epidermidis*).

45 En una realización, el anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una región variable de la cadena pesada y seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácidos que comprende una región variable de la cadena ligera y seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 6. En otra realización, el anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una región variable de la cadena pesada derivada de un hibridoma depositado que tiene N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 o PTA-5933 en la ATCC, y una secuencia de aminoácidos que comprende una región variable de la cadena ligera derivada de un hibridoma depositado que tiene N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 o PTA-5933 en la ATCC.

50 El anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

55 El anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, aislado puede comprender una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada procedente de un hibridoma depositado que tiene el N° de acceso PTA-5931 (F598) y una secuencia de aminoácidos que comprende una región variable de la cadena ligera procedente del hibridoma depositado que tiene el N° de acceso PTA-5931 (F598), o una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada procedente del hibridoma depositado que tiene el N° de acceso PTA-5932 (F628) y una secuencia de aminoácidos que comprende una región variable de la cadena ligera procedente del hibridoma depositado que

tiene el N° de acceso PTA-5932 (F628), o una secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada procedente del hibridoma depositado que tiene el N° de acceso PTA-5933 (F630) y una secuencia de aminoácidos que comprende la región variable de la cadena ligera procedente del hibridoma depositado que tiene el N° de acceso PTA-5933 (F630).

- 5 En una realización, el péptido aislado está conjugado a una marcación detectable. La marcación detectable puede ser una marcación detectable *in vitro* o *in vivo*.

- En una realización, la composición comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, el péptido aislado tal como el anticuerpo, o fragmento del anticuerpo, aislado está presente en una cantidad eficaz para inhibir una infección de una cepa bacteriana que expresa la PNAG (tal como una infección estafilocócica) o en una cantidad eficaz para detectar una cepa bacteriana que expresa la PNAG (tal como estafilococos) en un sujeto o en una muestra del mismo.
- 10

En una realización, el péptido aislado se fija selectivamente a la PNAG estafilocócica. En otra realización, el péptido aislado se fija selectivamente a la dPNAG estafilocócica.

- Aún en otro aspecto, la invención da a conocer una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una CDR de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica.
- 15

En una realización, la secuencia nucleotídica se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 24. En otra realización, la secuencia nucleotídica se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

- 20 En una realización, el ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de la región variable de la cadena pesada procedente de un hibridoma que tiene el N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 o PTA-5933. En otra realización, el ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de la región variable de la cadena ligera procedente de un hibridoma que tiene el N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 o PTA-5933. Aún en otra realización, el ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico de CDR de la cadena pesada procedente de un hibridoma que tiene el N° de acceso
- 25 PTA-5931; PTA-5932 o PTA-5933 o es una molécula de ácido nucleico de la CDR de la cadena ligera procedente de un hibridoma que tiene el N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 o PTA-5933.

La invención da a conocer adicionalmente, en otros aspectos, vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácido nucleico aisladas anteriormente mencionadas, operativamente unidas a un promotor y células transformadas o transfectadas con tales vectores de expresión.

- 30 En otros aspectos, la descripción da a conocer una célula aislada que produce un anticuerpo monoclonal contra la PNAG/dPNAG estafilocócica (F598) y que tiene el N° de acceso PTA-5931 en la ATCC, una célula aislada que produce un anticuerpo monoclonal contra la PNAG/dPNAG estafilocócica (F628) y que tiene el N° de acceso PTA-5932 en la ATCC, y una célula aislada que produce un anticuerpo monoclonal contra la PNAG/dPNAG estafilocócica (F630) y que tiene el N° de acceso PTA-5933 en la ATCC. La descripción da a conocer adicionalmente, en otros
- 35 aspectos, el anticuerpo monoclonal aislado producido por las células aisladas depositadas que se han mencionado más arriba, o fragmentos de anticuerpo del mismo. El fragmento de anticuerpo puede ser, pero sin limitarse a ellos, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fd o un fragmento Fab. En una realización relacionada, el fragmento mejora la opsonofagocitosis de las cepas bacterianas que expresan la PNAG (p. ej., estafilococos tales como, pero sin limitarse a ellos, *S. aureus* o *S. epidermidis*).

- 40 En otro aspecto, la descripción da a conocer un procedimiento para detectar las cepas bacterianas que expresan la PNAG (tales como los estafilococos) en un sujeto o una muestra de un sujeto. El procedimiento comprende determinar un nivel de la prueba de fijación de un péptido aislado, o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, en un sujeto o en una muestra del mismo, y comparar el nivel de la prueba de fijación a un control, en donde el péptido aislado se fija selectivamente a la PNAG/dPNAG estafilocócica y comprende una CDR de fijación a la
- 45 PNAG/dPNAG estafilocócica, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, y en donde un nivel de la prueba de fijación que sea mayor que el del control será indicativo de la presencia de la cepa bacteriana (p. ej., estafilococos) en la muestra. Las bacterias a detectar pueden ser estafilococos, *E. coli*, *Yersinia pestis* (*Y. pestis*), *Y. enterocolitica*, *Xanthomonas axonopodis* (*X. axonopodis*), *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *A. pleuropneumoniae*, *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), *B. parapertussis* o *B. bronchiseptica*. La invención también da a conocer procedimientos para el tratamiento y la
- 50 detección de infecciones de plantas por bacterias que expresan la PNAG, tal como *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*).

En una realización, el nivel de la prueba de fijación se mide *in vitro*.

- En otro aspecto, la descripción da a conocer en un procedimiento para tratar a un sujeto que tiene, o que corre el riesgo de padecer, una infección por una cepa bacteriana que expresa la PNAG (p. ej., una infección por estafilococos). El procedimiento comprende administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento un péptido aislado que se fija selectivamente a la PNAG/dPNAG estafilocócica, y comprende una CDR de fijación a la PNAG/dPNAG
- 55

estafilocócica o una variante funcionalmente equivalente de la misma, en una cantidad eficaz para inhibir la infección. En otra realización, el péptido aislado está conjugado a un agente citotóxico.

En una realización, el sujeto tiene, o corre el riesgo de padecer, una infección por estafilococos, tal como, pero sin limitarse a ellos, una infección por *S. aureus* o por *S. epidermidis*. En otra realización, el sujeto tiene, o corre el riesgo de padecer, una infección por *E. coli*, *Yersinia pestis* (*Y. pestis*), *Y. enterocolitica*, *Xanthomonas axonopodis* (*X. axonopodis*), *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *A. pleuropneumoniae*, *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), *B. parapertussis* o *B. bronchiseptica*.

Las infecciones bacterianas anteriores son la base de afecciones tales como gastroenteritis, infecciones de las vías urinarias, pestes, tos ferina, infecciones del torrente circulatorio e infecciones dentales (periodontitis). La descripción pretende tratar estas últimas afecciones mediante el tratamiento de la infección bacteriana subyacente. La detección y composiciones para el tratamiento dados a conocer en la presente memoria son adecuados para sujetos humanos y no humanos que tienen, o que corren el riesgo de padecer, tales infecciones. Los sujetos no humanos incluyen animales agrarios tales como vacas y cerdos, pero sin limitarse a ellos.

Ralstonia solanacearum (*R. solanacearum*) es otra bacteria que expresa la PNAG; sin embargo, se considera un patógeno vegetal más que un patógeno de animal. La invención contempla la detección y el tratamiento de especies vegetales que tienen tales infecciones mediante el uso de los péptidos de fijación dados a conocer en la presente memoria, preferiblemente conjugados a un marcador detectable o citotóxico, según el procedimiento.

Aún en otro aspecto, la descripción da a conocer un procedimiento para tratar una infección por una cepa bacteriana que expresa la PNAG (p. ej., infección por estafilococos) que comprende administrar a un sujeto que lo necesita un péptido de fijación a la PNAG/dPNAG que reduce la carga bacteriana en un sujeto al menos al 50% en al menos 4 horas tras la exposición a una bacteria que expresa la PNAG en una cantidad eficaz para tratar la infección.

En una realización, el péptido de fijación a la PNAG/dPNAG es un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo. En una realización, la infección es una infección por estafilococos. En una realización, la infección por estafilococos es una infección por *S. aureus* o una infección por *S. epidermidis*. En otra realización, la infección es una infección por *E. coli*, *Yersinia pestis* (*Y. pestis*), *Y. enterocolitica*, *Xanthomonas axonopodis* (*X. axonopodis*), *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *A. pleuropneumoniae*, *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), *B. parapertussis* o *B. bronchiseptica*. Las infecciones por *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) también están contempladas en la invención, aunque éstas afectan a las plantas en lugar de a los animales. En otra realización, el péptido de fijación a la PNAG/dPNAG se administra antes de la exposición a la bacteria, tal como, pero sin limitarse a ello, al menos 24 horas antes de la exposición a la bacteria.

En una realización, el péptido de fijación a la PNAG/dPNAG reduce la carga bacteriana de un sujeto al menos el 60% en al menos 4 horas después de la exposición a la bacteria. En otra realización, el péptido de fijación a la PNAG/dPNAG reduce la carga bacteriana de un sujeto al menos el 50% en 2 horas tras la exposición a la bacteria. Aún en otra realización, el péptido de fijación a la PNAG/dPNAG reduce la carga bacteriana de un sujeto al menos el 60% en 2 horas tras la exposición a la bacteria. Las bacterias que expresan la PNAG incluyen, pero sin limitarse a ellas, estafilococos, *E. coli*, *Yersinia pestis* (*Y. pestis*), *Y. enterocolitica*, *Xanthomonas axonopodis* (*X. axonopodis*), *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *A. pleuropneumoniae*, *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*, que afecta a los animales, y *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) que afecta a las plantas.

Éstas y otras realizaciones se describirán con mayor detalle en la presente memoria.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico que muestra la afinidad de fijación de los anticuerpos monoclonales (Acm) F598, F628 y F630 (en la forma IgG2) a la PNAG nativa. El Acm contra el MEP de *P. aeruginosa* se utiliza como control negativo.

La figura 2 es un gráfico que muestra la afinidad de fijación de los Acm F598, F628 y F630 (en la forma IgG2) a la dPNAG.

La figura 3 es un gráfico que muestra los resultados de un ELISA competitivo utilizando la PNAG y los Acm F598, F628 y F630 (en la forma IgG2).

La figura 4 es un gráfico que muestra la afinidad de fijación de los Acm F598, F628 y F630 (en la forma IgG1) a la PNAG nativa.

La figura 5 es un gráfico que muestra la afinidad de fijación de los Acm F598, F628 y F630 (en la forma IgG1) a la dPNAG.

La figura 6 es un gráfico que muestra la actividad de fijación del complemento de los Acm F598, F628 y F630 tanto en la forma IgG1 como la IgG2 sobre la PNAG. El Acm contra el MEP de *P. aeruginosa* se utiliza como control negativo.

5 La figura 7 es un gráfico que muestra la actividad de opsonofagocitosis de los Acm F598, F628 y F630 en la forma IgG1 y la IgG2 contra la cepa Mn8 de *S. aureus*.

La figura 8A es un gráfico de barras que muestra los resultados promediados que comparan la cantidad de estafilococos en la sangre de los ratones (8 por grupo) a los que se les dio un Acm humano de tipo IgG1 de control contra el alginato de *P. aeruginosa* o el Acm F598 específico contra la PNAG/dPNAG (en la forma IgG1) y que demuestra que el Acm F598 proporciona una protección pasiva contra la exposición a *S. aureus*.

10 La figura 8B es un gráfico que muestra los resultados de la protección contra la exposición a *S. aureus* en distintos ratones, en donde se describen las UFC por mililitro de sangre tras la administración de un Acm humano de tipo IgG1 de control contra el alginato de *P. aeruginosa* y el Acm F598 específico contra la PNAG/dPNAG (en la forma IgG1).

15 La fig. 8C es un gráfico que muestra los resultados de protección contra la exposición a *S. aureus* en distintos ratones FVB utilizando el Acm F598 y el Acm de control contra el MEP de *P. aeruginosa*.

La figura 9 es una inmunotransferencia que muestra la expresión de la PNAG en las cepas de *E. coli* de una IVU marcadas con D-U y que incluye un aislado que sobreexpresa el *pga* de *E. coli* (esquina superior derecha).

La figura 10 es un gráfico de barras que muestra el nivel de muerte de los aislados de *E. coli* con el antisuero policlonal generado contra la dPNAG de *S. aureus*.

20 Las figuras 11A y 11B son gráficos que muestran el nivel de muerte de aislados de *E. coli* que expresan una cantidad relativamente elevada (cepa U) e intermedia (cepa P) de la PNAG, respectivamente, con el antisuero policlonal generado contra la dPNAG y la PNAG.

La figura 12 es un gráfico de barras que muestra la reducción en UFC de diferentes cepas bacterianas que expresan la PNAG utilizando F598, F628 y F630.

25 La figura 13 es un gráfico que muestra la proporción de bacterias de *S. aureus* que mueren por la acción de F598 y F628 en función de presencia o ausencia del gen *icaB*.

La figura 14 es un gráfico que muestra la proporción de bacterias de *S. aureus* que mueren por la acción de F598 y F628 en función de la sobreexpresión del gen *icaB*.

Se debe entender que las figuras no son necesarias para la aplicación de la invención.

30 Breve descripción de la lista de secuencias

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo F598.

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo F598.

35 La SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo F628.

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo F628.

La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo F630.

La SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo F630.

40 La SEQ ID NO: 7 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo F598.

La SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo F598.

La SEQ ID NO: 9 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo F598.

La SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo F598.

La SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo F598.

45 La SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo F598.

ES 2 738 112 T3

- La SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo F628.
- La SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo F628.
- La SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo F628.
- La SEQ ID NO: 16 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo F628.
- 5 La SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo F628.
- La SEQ ID NO: 18 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo F628.
- La SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo F630.
- La SEQ ID NO: 20 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo F630.
- La SEQ ID NO: 21 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo F630.
- 10 La SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo F630.
- La SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo F630.
- La SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo F630.
- La SEQ ID NO: 25 es la secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo F598.
- La SEQ ID NO: 26 es la secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo F598.
- 15 La SEQ ID NO: 27 es la secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo F628.
- La SEQ ID NO: 28 es la secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo F628.
- La SEQ ID NO: 29 es la secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo F630.
- La SEQ ID NO: 30 es la secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo F630.
- La SEQ ID NO: 31 es la secuencia nucleotídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo F598.
- 20 La SEQ ID NO: 32 es la secuencia nucleotídica de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo F598.
- La SEQ ID NO: 33 es la secuencia nucleotídica de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo F598.
- La SEQ ID NO: 34 es la secuencia nucleotídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo F598.
- La SEQ ID NO: 35 es la secuencia nucleotídica de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo F598.
- La SEQ ID NO: 36 es la secuencia nucleotídica de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo F598.
- 25 La SEQ ID NO: 37 es la secuencia nucleotídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo F628.
- La SEQ ID NO: 38 es la secuencia nucleotídica de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo F628.
- La SEQ ID NO: 39 es la secuencia nucleotídica de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo F628.
- La SEQ ID NO: 40 es la secuencia nucleotídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo F628.
- La SEQ ID NO: 41 es la secuencia nucleotídica de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo F628.
- 30 La SEQ ID NO: 42 es la secuencia nucleotídica de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo F628.
- La SEQ ID NO: 43 es la secuencia nucleotídica de la CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo F630.
- La SEQ ID NO: 44 es la secuencia nucleotídica de la CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo F630.
- La SEQ ID NO: 45 es la secuencia nucleotídica de la CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo F630.
- La SEQ ID NO: 46 es la secuencia nucleotídica de la CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo F630.
- 35 La SEQ ID NO: 47 es la secuencia nucleotídica de la CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo F630.
- La SEQ ID NO: 48 es la secuencia nucleotídica de la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo F630.
- La SEQ ID NO: 49 es la secuencia nucleotídica del cebador de la constante λ .

La SEQ ID NO: 50 es la secuencia nucleotídica del cebador de Hu λ sig 5.

La SEQ ID NO: 51 es la secuencia nucleotídica del cebador de la constante de la cadena pesada.

La SEQ ID NO: 52 es la secuencia nucleotídica del cebador VH7LDRHU.

La SEQ ID NO: 53 es la secuencia nucleotídica del cebador de Hu λ sig 1.

5 La SEQ ID NO: 54 es la secuencia nucleotídica del cebador VH1LDRHU.

La SEQ ID NO: 55 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de F598 que incluye algo de la secuencia de la región constante.

La SEQ ID NO: 56 es la secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada de F598 que incluye algo de la secuencia de la región constante.

10 La SEQ ID NO: 57 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de F598 que incluye algo de la secuencia de la región constante.

La SEQ ID NO: 58 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de F628 que incluye algo de la secuencia de la región constante.

15 La SEQ ID NO: 59 es la secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada de F628 que incluye algo de la secuencia de la región constante.

La SEQ ID NO: 60 es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de F630 que incluye algo de la secuencia de la región constante.

La SEQ ID NO: 61 es la secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena ligera de F630 que incluye algo de la secuencia de la región constante.

20 Descripción detallada de la invención

La descripción da a conocer composiciones y procedimientos útiles, entre otras cosas, para la inmunización de los humanos y de los animales contra la infección por cepas bacterianas que expresan la poli-N-acetil glucosamina (PNAG) así como la detección de tales patógenos. Tales cepas bacterianas incluyen, pero sin limitarse a ellas, estafilococos que no expresan la coagulasa y estafilococos que sí la expresan, tal como *S. aureus* y *S. epidermis*. La descripción además da a conocer péptidos que se fijan a distintas formas de la PNAG expresada por algunas cepas bacterianas.

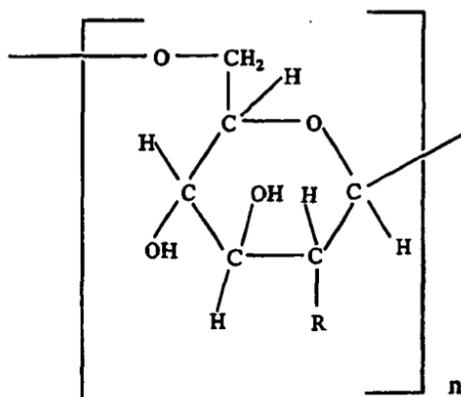
La invención se basa en parte en el descubrimiento, aislamiento y caracterización de una serie de anticuerpos monoclonales humanos que se fijan a distintas formas de PNAG (entre ellas las formas muy acetiladas, las formas poco acetiladas y las formas desacetiladas, tal y como se describe a continuación). Estos anticuerpos los producen los hibridomas depositados en la ATCC con los N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933 de la ATCC el 21 de abril de 2004 de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre patentes. Los hibridomas y los anticuerpos que producen se denominan F598, F628 y F630. Estos hibridomas se nombran repetidamente en la presente memoria. Se debe entender que la referencia a los hibridomas (o a los anticuerpos producidos por hibridomas) que tienen los N° de acceso PTA-5931, PTA.5932 y PTA-5933 en la ATCC hace referencia a los hibridomas antes mencionados.

35 Los hibridomas depositados se obtuvieron de linfocitos B recogidos de un sujeto humano que se recupera de una infección por estafilococos. Los linfocitos B se transformaron con el virus de Epstein-Barr y luego se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón-humano HMMA 2.5 para generar los hibridomas depositados.

La PNAG existe en la naturaleza en distintas formas que difieren según el número de sustituciones con acetato. Las sustituciones con acetato pueden oscilar de 0 al 100%. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la PNAG se refiere a la «PNAG nativa» que corresponde a la mezcla de PNAG que se produce de forma natural con el intervalo de sustituciones con acetato antes mencionado. La PNAG poco acetilada es una subpoblación de polisacáridos de la PNAG en la que menos del 50% de los grupo amino de la glucosamina están sustituidos con acetato. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología dPNAG abarca tanto la PNAG poco acetilada como la PNAG completamente desacetilada (a saber, la dPNAG se refiere a un subgrupo de polisacáridos de la PNAG que comprende de 0 a menos del 50% de sustituyentes de acetato).

45

PNAG tiene la estructura siguiente:



donde n es un entero que oscila de 2 a 300 o más, R se selecciona del grupo que consiste en -NH-CO-CH₃ y -NH₂.

- 5 La PNAG tiene un enlace β 1-6 (a saber, se compone de unidades de monómero de glucosamina unidas entre sí mediante enlaces β 1-6).

La PNAG puede ser un homopolímero. Un homopolímero es uno en el que los grupos R de los restos de glucosamina son idénticos. El homopolímero puede comprender únicamente grupos R sin sustituir (a saber, R = NH₂). La PNAG también puede ser un heteropolímero con una mezcla de grupos NH₂ y NH-CO-CH₃ en la posición

- 10 R. La dPNAG tiene la misma estructura que la PNAG, salvo que menos del 50% de los grupos R son -NH-CO-CH₃.

La PNAG y la dPNAG se pueden encontrar de forma natural y se pueden preparar de toda cepa bacteriana que lleve el locus *ica* (o un locus homólogo tal como el locus *pga*), que produzca las enzimas biosintéticas codificadas por este locus, y que utilice estas enzimas para sintetizar la PNAG o la dPNAG. Las bacterias que expresan la PNAG incluyen estafilococos tales como *S. aureus* y *S. epidermidis*, *E. coli* tales como las cepas de *E. coli* O157:H7 y

- 15 CFT073, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Xanthomonas axonopodis*, *Pseudomonas fluorescens* (todas las cuales son especies secuenciadas con un locus *pgaABCD* completo) y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (AA), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Ap), *Ralstonia solanacearum* (p. ej., la forma megaplasmídica), *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *Bordetella bronchiseptica* (todas las cuales contienen los genes *pgaABC*, pero al parecer carecen de un homólogo de *pgaD*). Al parecer, no se necesita el gen *pgaD* para la expresión de la PNAG

- 20 ya que las especies que codifican *pgaABC* tales como AA y Ap (recogidas más arriba) fabrican la PNAG.

Las bacterias que expresan la PNAG son bacterias que llevan el locus *ica* o un locus homólogo tal como el locus *pga*. Por ejemplo, los estafilococos que expresan la PNAG son estafilococos que llevan el locus *ica*. Las cepas bacterianas que expresan la PNAG incluyen las cepas bacterianas que expresan la dPNAG. Por ejemplo, los estafilococos que expresan la PNAG incluyen los estafilococos que expresan la dPNAG. Estas cepas incluyen, pero

- 25 sin limitarse a ellas, *S. epidermidis* y *S. aureus*, así como otras cepas (p. ej., *S. carnosus*) que están transformadas con los genes del locus *ica* o locus homólogo, tal como el locus *pga*. En particular, la PNAG puede prepararse de cepas específicas, entre ellas *S. epidermidis* RP62A (número de la ATCC 35984), *S. epidermidis* RP12 (número de la ATCC 35983), *S. epidermidis* M187, *S. carnosus* RP26A (número de la ATCC 35984), *S. epidermidis* RP12 (número de la ATCC 35983), *S. epidermidis* M187, *S. carnosus* TM300 (pCN27), *S. aureus* RN4220 (pCN27), *S. aureus* MN8

- 30 mucoide, *E. coli* O157:H7 y *E. coli* CFT073. La dPNAG también puede sintetizarse *de novo* o mediante la modificación de la PNAG nativa. La PNAG y la dPNAG se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en Maira-Litran et al., *Infect. Immun.* de agosto 2002; 70(8): 4433, y en la solicitud de patente de los EE.UU. 10/713.790 registrada el 12 de noviembre de 2003.

La PNAG también la expresan otras bacterias que incluyen, pero sin limitarse a ellas, *E. coli*, *Yersinia pestis* (*Y. Pestis*), *Y. enterocolitica*, *Xanthomonas axonopodis* (*X. axonopodis*), *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *A. pleuropneumoniae*, *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*), *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. Tal y como se describe en los ejemplos, 17 de los 18 aislados de *E. coli* de infección de las vías urinarias llevaban el locus *pga*. De éstos, aproximadamente un tercio expresaba una cantidad relativamente alta de PNAG, aproximadamente un tercio expresaba una cantidad relativamente intermedia de PNAG, y el tercio restante expresaba una cantidad relativamente baja de PNAG. Los análisis anteriores se llevaron a cabo mediante inmunotransferencia con el uso de los antisueros generados contra la PNAG de *S. aureus*. Esto es la prueba de que la PNAG de una especie puede utilizarse para generar anticuerpos (y por consiguiente péptidos de fijación) contra otras especies que expresan la PNAG.

- 45 Así pues, en un aspecto, la descripción da a conocer péptidos de fijación y anticuerpos. Los anticuerpos de la invención se fijan a la PNAG/dPNAG estafilocócica y mejoran la opsonofagocitosis de las especies que elaboran la

PNAG (a saber, anticuerpos monoclonales humanos para opsonofagocitosis específicos contra la PNAG/dPNAG estafilocócica). Los anticuerpos se denominan en la presente memoria anticuerpos contra la PNAG/dPNAG estafilocócica. Se debe entender, sin embargo, que tales anticuerpos son capaces de fijarse a la PNAG/dPNAG sin tener en cuenta su procedencia. En consecuencia, los anticuerpos de la invención que se definen por su fijación a, por ejemplo, la PNAG/dPNAG estafilocócica y que son capaces de detectar y/o estimular la opsonofagocitosis de, por ejemplo, especies de estafilococos son también capaces de detectar y/o estimular la opsonofagocitosis de las bacterias que expresan la PNAG que no procede de los estafilococos.

Un anticuerpo contra la PNAG/dPNAG estafilocócica es un anticuerpo que a) se fija tanto a la PNAG como a la dPNAG, b) se fija a la PNAG, pero no a la dPNAG, o c) se fija a la dPNAG, pero no a la PNAG. Los anticuerpos preferidos se fijan a la dPNAG.

Los anticuerpos F598, F628 y F630 son igualmente capaces de fijarse a la PNAG nativa y algunos son también capaces de fijarse a la dPNAG. Aunque no hay ninguna intención de comprometerse con ningún mecanismo ni teoría, se cree que los anticuerpos que reconocen la dPNAG tienen más probabilidades de fijarse específicamente a partes de la molécula de la PNAG que no contienen grupos acetato, en vez de a las partes de la molécula que incluyen sustituyentes tales como las sustituciones con acetato. Por ejemplo, los anticuerpos que se fijan a la dPNAG pueden reconocer y fijarse al esqueleto de la PNAG en vez de a sus sustituciones de acetato. Estos anticuerpos intervendrán en la muerte por opsonofagocitosis de las bacterias que expresan la PNAG tal como, pero sin limitarse a ellos, los aislados de estafilococos o de *E. coli* de sujetos humanos infectados. Cuando se utilizan *in vivo* en los modelos murinos de infección por estafilococos, los anticuerpos proporcionan protección ante la exposición a los estafilococos. Pueden variar las condiciones en las que cada anticuerpo monoclonal proporciona protección. Estos y otros hallazgos se describen con mayor detalle en los ejemplos.

Aunque no hay ninguna intención de comprometerse con ninguna teoría concreta, se cree que la progresión de la infección de las bacterias que expresan la PNAG (tal como la infección por estafilococos) se debe a que no se produce una respuesta inmunitaria adecuada que elimine el microorganismo patógeno. En particular, uno de los defectos es que no se producen anticuerpos opsonofagocíticos específicos contra la PNAG (tal como la producida por los estafilococos).

Los anticuerpos opsonofagocíticos son anticuerpos que se depositan por sí solos sobre un antígeno o sobre una bacteria con o sin la capacidad de reclutar la deposición adicional de los componentes del sistema del complemento y facilitan la fagocitosis del antígeno o de la bacteria por las células fagocíticas, tales como las células presentadoras de antígeno (p. ej., macrófagos o células dendríticas) o los neutrófilos polimorfonucleados. La fagocitosis puede continuar de una manera mediada por Fc en la que sólo interviene el anticuerpo fijado al antígeno o a la bacteria. La fagocitosis también puede continuar con la fijación de los receptores del complemento de los fagocitos a las opsoninas del complemento en la superficie bacteriana en la que se hayan depositado los anticuerpos. La fagocitosis también puede transcurrir por una combinación de estos dos mecanismos. Por tanto, la capacidad de proporcionar anticuerpos opsonofagocíticos al sitio de infección debe contribuir a erradicar la infección con más eficacia de lo que era posible anteriormente.

Tanto la PNAG como la dPNAG son muy inmunógenas *in vivo* y son capaces de desencadenar anticuerpos que intervienen en la muerte por opsonización y en la protección ante la infección; se propone que la dPNAG desencadena preferiblemente anticuerpos que intervienen en la muerte por opsonización y en la protección ante la infección. El polisacárido dPNAG es, por lo tanto, útil, entre otras cosas, para la generación de respuestas inmunitarias, que incluyen las respuestas inmunitarias dependientes del anticuerpo, contra las cepas bacterianas que expresan la PNAG tales como, pero sin limitarse a ellos, los estafilococos. Los anticuerpos desencadenados tras la administración de la dPNAG reconocen la dPNAG y, en las realizaciones importantes, también reconocen las formas muy acetiladas de PNAG.

Así pues, la invención se refiere a la identificación y uso de péptidos que se fijan a la PNAG y/o a la dPNAG. Los péptidos que se fijan a la PNAG y/o a la dPNAG estafilocócica se denominan en la presente memoria péptidos de fijación a la PNAG/dPNAG. De nuevo se debe entender que tales péptidos de fijación son capaces de fijarse a la PNAG/dPNAG sin tener en cuenta su procedencia. Los péptidos de fijación a la PNAG/dPNAG incluyen a) péptidos que se fijan tanto a la PNAG como a la dPNAG, b) péptidos que se fijan a la PNAG y no a la dPNAG (denominados en la presente memoria péptidos de fijación a la PNAG) y c) péptidos que se fijan a la dPNAG y no a la PNAG (denominados en la presente memoria péptidos de fijación a la dPNAG). En las realizaciones preferidas, los péptidos se fijan al menos a la dPNAG (por lo que abarcan las categorías antes mencionadas (a) y (c)).

Los péptidos comprenden mínimamente regiones que se fijan a la PNAG/dPNAG (a saber, regiones de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica). Tal y como se utiliza en la presente memoria, una región de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica es una región que a) se fija tanto a la PNAG como a la dPNAG, b) se fija a la PNAG, pero no a la dPNAG (denominada en la presente memoria una región de fijación a la PNAG), o c) se fija a la dPNAG, pero no a la PNAG (denominada en la presente memoria una región de fijación a la dPNAG), sin tener en cuenta la procedencia de la PNAG/dPNAG. Preferiblemente, la región de fijación a la PNAG/dPNAG es una región que se fija al menos a la dPNAG (y, por lo tanto, abarca las categorías (a) y (c)). Las regiones de fijación a la PNAG/dPNAG

estafilocócica proceden de las regiones de fijación a la PNAG/dPNAG de los anticuerpos de la invención, o alternativamente, son variantes funcionalmente equivalentes de tales regiones.

Por consiguiente, las regiones variables y las CDR de los anticuerpos descritos en la presente memoria o producidos por los hibridomas depositados en la ATCC con los N° de acceso de la ATCC PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933 el 21 de abril de 2004 son dos clases particularmente importantes de regiones de fijación a la PNAG/dPNAG procedentes de anticuerpo. Los ácidos nucleicos de las CDR y de las regiones variables se pueden clonar a partir de las células productoras de anticuerpos tales como las que están en depósito descritas en los ejemplos.

Un anticuerpo, como se sabe bien en la técnica, es un ensamblaje de cadenas polipeptídicas unidas mediante puentes disulfuro. Dos cadenas de aminoácidos principales, denominadas la cadena ligera y la cadena pesada, constituyen los isotipos estructurales principales del anticuerpo. Tanto las cadenas ligeras como las pesadas se dividen a su vez en subregiones que se denominan regiones variables y regiones constantes. En algunos casos, los péptidos engloban las regiones variables de la cadena ligera y pesada de anticuerpo de los anticuerpos anteriores. La región variable de la cadena pesada es un péptido cuya longitud generalmente oscila de 100 a 150 aminoácidos. La región variable de cadena ligera es un péptido cuya longitud generalmente oscila de 80 a 130 aminoácidos.

Tal y como se conoce bien en la técnica, las CDR de un anticuerpo son las porciones de la región variable del anticuerpo que son en buena parte responsables de la especificidad de fijación de un anticuerpo por un determinado antígeno o epítipo antigénico. Las CDR interactúan directamente con el epítipo del antígeno (véase, en general, Clark, 1986; Roitt, 1991). Tanto entre las regiones variables de la cadena ligera como entre las regiones variables de la cadena pesada de las inmunoglobulinas de tipo IgG hay cuatro regiones flanqueantes (FR1 a FR4) separadas respectivamente por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3). Las regiones flanqueantes (FR, por su nombre en inglés) mantienen la estructura terciaria del parátipo, que es la porción del anticuerpo que interviene en la interacción con el antígeno o con el epítipo antigénico. Las CDR, y en particular la CDR3, y más en particular la CDR3 de la cadena pesada, contribuye sustancialmente a la especificidad del anticuerpo. Ya que las CDR, y en particular la CDR3, confieren una gran parte de la especificidad antigénica del anticuerpo, estas regiones se pueden incorporar a otros anticuerpos o péptidos para conferir la misma especificidad antigénica a la de dicho anticuerpo o péptido.

Preferiblemente, los péptidos de fijación a la PNAG/dPNAG abarcan mínimamente al menos una CDR de las descritas en la presente memoria o las que se pueden obtener de los hibridomas depositados (a saber, una CDR de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica). Tal y como se utiliza en la presente memoria, una CDR de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica es una CDR descrita en la presente memoria o es una CDR procedente de los hibridomas depositados con los N° de acceso de ATCC PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933. Las CDR de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica incluyen a) CDR que se fijan tanto a la PNAG como a la dPNAG, b) CDR que se fijan a la PNAG y no a la dPNAG (denominadas en la presente memoria CDR de fijación a la PNAG) y c) CDR que se fijan a la dPNAG y no a la PNAG (denominadas en la presente memoria CDR de fijación a la dPNAG), sin tener en cuenta la procedencia de la PNAG/dPNAG. Estos péptidos contienen preferiblemente al menos una CDR de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica.

La región de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica puede ser una CDR1 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica, una CDR2 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica o una CDR3 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica, todas las cuales proceden de los anticuerpos y de las cadenas variables de anticuerpo descritas en la presente memoria.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «CDR1 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica» es una CDR1 que se fija, preferiblemente de forma específica, a la PNAG/dPNAG estafilocócica, y que procede o bien de las regiones variables de la cadena ligera o pesada de los anticuerpos descritos en la presente memoria, o bien la producen los hibridomas depositados con los N° de acceso de ATCC PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933. Puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 22. Se aplican definiciones parecidas respectivamente a las CDR2 y CDR3 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica.

Una «CDR2 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica» es una CDR2 que se fija, preferiblemente de forma específica, a la PNAG/dPNAG estafilocócica, y que procede o bien de las regiones variables de la cadena ligera o pesada de los anticuerpos descritos en la presente memoria, o bien la producen los hibridomas depositados con los N° de acceso de ATCC PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933. Puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 23.

Una «CDR3 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica» es una CDR3 que se fija, preferiblemente de forma específica, a la PNAG/dPNAG estafilocócica, y que procede o bien las regiones variables de la cadena ligera o pesada de los anticuerpos descritos en la presente memoria, o bien la producen los hibridomas depositados con los N° de acceso de ATCC PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933. Puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 24.

Además de las secuencias recogidas anteriormente, la descripción pretende abarcar la variantes funcionalmente equivalentes de esas secuencias, que incluyen las variantes por sustitución conservativa bien en el aminoácido o bien la secuencia nucleotídica, como se describe con mayor detalle a continuación.

- Los péptidos de la descripción, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, los anticuerpos opsonofagocíticos descritos en la presente memoria, son útiles, entre otras cosas, para los procedimientos diagnósticos destinados a detectar, en un sujeto o en una muestra del mismo, el antígeno de PNAG/dPNAG o las bacterias que expresan la PNAG (tal como, pero sin limitarse a ellas, las bacterias estafilocócicas que expresan la PNAG). Como mínimo, los péptidos útiles en estos procedimientos sólo necesitan reconocer y fijarse a la PNAG/dPNAG (tal como la PNAG/dPNAG estafilocócica) sin tener en cuenta si también estimulan la opsonización y la fagocitosis. En las realizaciones importantes, los anticuerpos y fragmentos de los mismos se fijan selectivamente a la PNAG/dPNAG. De acuerdo con esto, les basta con poseer una o más de las CDR procedentes de los clones de los anticuerpos descritos en la presente memoria o producidos por los hibridomas depositados con los N° de acceso de la ATCC PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933. En las realizaciones preferidas, los péptidos comprenden una CDR3 de fijación a la PNAG/dPNAG, e incluso más preferiblemente, los péptidos comprenden una CDR3 de fijación a la PNAG/dPNAG procedente de la cadena pesada. Se debe entender que no se necesitan todas las CDR para efectuar la fijación a la PNAG/dPNAG. No obstante, en algunas realizaciones, los péptidos comprenden todas las CDR de un determinado clon de anticuerpo descrito en la presente memoria o producido por los hibridomas depositados en los N° de acceso de la ATCC PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933.

- Además, se debe entender que la descripción también abarca el intercambio de las CDR entre las regiones variables dadas a conocer en la presente memoria. Preferiblemente, una CDR de la región variable de la cadena pesada se intercambia con otra CDR de la cadena pesada y, asimismo, una CDR de la región variable de la cadena ligera se intercambia con otra CDR de la cadena ligera.

Las secuencias de aminoácidos de las CDR de las cadenas variables descritas en la presente descripción son como se describe a continuación:

Clon	Cadena	CDR	SEQ ID NO:	Secuencia
F598	P	CDR1	7	GYYSWS
F598	P	CDR2	8	YIHYSRSTNSNPALKS
F598	P	CDR3	9	DTYYYDSGDYEDAFDI
F598	L	CDR1	10	TLSSGHSNYAIA
F598	L	CDR2	11	VNRDGSHIRGD
F598	L	CDR3	12	QTWGAGIRV
F628	P	CDR1	13	NYYWS
F628	P	CDR2	14	YIHYSGSTNSNPALKS
F628	P	CDR3	15	DTYESSGHWFGLDV
F628	L	CDR1	16	TLDSEHSRYTIA
F628	L	CDR2	17	VKSDGSHSKGD
F628	L	CDR3	18	QTWGPGIRV
F630	P	CDR1	19	NFGIS
F630	P	CDR2	20	WVSTYNGRTNYAQKFRG
F630	P	CDR3	21	DYYETSGYAYDDFAI
F630	L	CDR1	22	TLSSGHSTYAIA
F630	L	CDR2	23	VNSDGSHTKGD
F630	L	CDR3	24	QTWGPGIRV

ES 2 738 112 T3

Las secuencias nucleotídicas de las CDR de las cadenas variables descritas en la presente descripción son como siguen:

Clon	Cadena	CDR	SEQ ID NO:	Secuencia
F598	P	CDR1	31	GGT TAC TAC TGG AGT
F598	P	CDR2	32	TAT ATT CAT TAT AGT AGG AGC ACC AAC TCC AAC CCC GCC CTC AAG AGT
F598	P	CDR3	33	GAT ACC TAT TAC TAT GAT AGT GGT GAT TAT GAG GAT GCT TTT GAT ATT
F598	L	CDR1	34	ACT CTG AGC AGT GGC CAC AGC AAC TAC GCC ATC GCT
F598	L	CDR2	35	GTT AAC AGA GAT GGC AGC CAC ATC AGG GGG GAC
F598	L	CDR3	36	CAG ACC TGG GGC GCT GGC ATT CGA GTG
F628	P	CDR1	37	AAT TAC TAC TGG AGT
F628	P	CDR2	38	TAT ATC CAT TAT AGT GGG AGC ACC AAC TCC AAT CCA TCC CTC AAG AGT
F628	P	CDR3	39	GAT ACT TAC TAT GAA AGT AGT GGT CAT TGG TTC GAC GGT TTG GAC GTC
F628	L	CDR1	40	ACT CTG GAC AGT GAA CAC AGC AGA TAC ACC ATC GCA
F628	L	CDR2	41	GTT AAG AGT GAT GGC AGT CAC AGC AAG GGG GAC
F628	L	CDR3	42	CAG ACT TGG GGC CCT GGC ATT CGA GTG
F630	P	CDR1	43	AAC TTT GGT ATC AGT
F630	P	CDR2	44	TGG GTC AGC ACT TAC AAT GGT CGC ACA AAT TAT GCA CAG AAG TTC CGG GGC
F630	P	CDR3	45	GAT TAC TAT GAG ACT AGT GGT TAC GCC TAT GAT GAT TTT GCG ATC
F630	L	CDR1	46	ACT CTG AGC AGT GGG CAC AGC ACC TAC GCC ATC GCG
F630	L	CDR2	47	GTC AAC AGT GAT GGC AGC CAC ACC AAG GGG GAC
F630	L	CDR3	48	CAG ACG TGG GGC CCT GGC ATT CGA GTG

Los péptidos también pueden comprender una región variable de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica. Una región variable de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica es una región variable (preferiblemente una región variable de anticuerpo como los descritos en la presente memoria o procedentes de hibridomas depositados con los N° de acceso de la ATCC PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933) que a) se fija tanto a la PNAG como a la dPNAG, b) se fija a PNAG, pero no a la dPNAG (denominada en la presente memoria una región variable de fijación a la PNAG) o c) se fija a la dPNAG, pero no a la PNAG (denominada en la presente memoria una región variable de fijación a la dPNAG), sin tener en cuenta la procedencia de la PNAG/dPNAG.

- 10 La presente descripción da a conocer al menos seis regiones variables diferentes, al menos tres de las cuales son regiones variables de la cadena pesada y al menos tres de las cuales son regiones variables de la cadena ligera. La SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 25 corresponden a la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada procedente del clon de anticuerpo F598. La SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 26 corresponden a la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera procedente del clon de anticuerpo F598. La SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 27 corresponden a la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada procedente del clon de anticuerpo F628. La SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 28 corresponden a la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera procedente del clon de anticuerpo F628. La SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 29 corresponden a la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada procedente del clon de anticuerpo F630. La SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 30 corresponden a la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera procedente del clon de anticuerpo F630.

- 25 Se debe entender que los ácidos nucleicos o los péptidos de la descripción pueden proceder de las secuencias dadas a conocer en la presente memoria o de los hibridomas depositados. Estas secuencias se pueden clonar (p. ej., mediante PCR) e insertar en un vector y/o células para producir péptidos que corresponden a las regiones variables completas o a fragmentos de las regiones variables completas, y anticuerpos que comprenden las regiones variables. Por lo tanto, se pueden generar anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden una combinación de regiones variables de las cadenas ligera o pesada. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención

puede comprender la región variable de la cadena pesada del Acm F598 (o del anticuerpo producido por el hibridoma depositado F598) y la región variable de la cadena ligera de F630 (o del anticuerpo producido por el hibridoma depositado F630). Debe entenderse que cualquier combinación de las regiones variables de las cadenas ligera o pesada (tal y como se describe en la presente memoria o que está comprendida en los anticuerpos producidos por los hibridomas depositados con los N° de acceso en la ATCC PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933) se pueden utilizar para la síntesis de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la invención.

De acuerdo con esto, la descripción abarca los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que están comprendidos en las siguientes combinaciones de regiones variables: SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 4, y SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

De igual forma, la invención o descripción abarca los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que están comprendidos en las siguientes combinaciones de regiones variables:

1. Región variable de la cadena pesada del hibridoma F598 que tiene el N° de acceso PTA-5931 en la ATCC y región variable de la cadena ligera del hibridoma F598 que tiene el N° de acceso PTA-5931 en la ATCC;
2. Región variable de la cadena pesada del hibridoma F598 que tiene el N° de acceso PTA-5931 en la ATCC y región variable de la cadena ligera del hibridoma F628 que tiene el N° de acceso PTA-5932 en la ATCC;
3. Región variable de la cadena pesada del hibridoma F598 que tiene el N° de acceso PTA-5931 en la ATCC y región variable de la cadena ligera del hibridoma F630 que tiene el N° de acceso PTA-5933 en la ATCC;
4. Región variable de la cadena pesada del hibridoma F628 que tiene el N° de acceso PTA-5932 en la ATCC y región variable de la cadena ligera del hibridoma F598 que tiene el N° de acceso PTA-5931 en la ATCC;
5. Región variable de la cadena pesada del hibridoma F628 que tiene el N° de acceso PTA-5932 en la ATCC y región variable de la cadena ligera del hibridoma F628 que tiene el N° de acceso PTA-5932 en la ATCC;
6. Región variable de la cadena pesada del hibridoma F628 que tiene el N° de acceso PTA-5932 en la ATCC y región variable de la cadena ligera del hibridoma F630 que tiene el N° de acceso PTA-5933 en la ATCC;
7. Región variable de la cadena pesada del hibridoma F630 que tiene el N° de acceso PTA-5933 en la ATCC y región variable de la cadena ligera del hibridoma F598 que tiene el N° de acceso PTA-5931 en la ATCC;
8. Región variable de la cadena pesada del hibridoma F630 que tiene el N° de acceso PTA-5933 en la ATCC y región variable de la cadena ligera del hibridoma F628 que tiene el N° de acceso PTA-5932 en la ATCC; y
9. Región variable de la cadena pesada del hibridoma F630 que tiene el N° de acceso PTA-5933 en la ATCC y región variable de la cadena ligera del hibridoma F630 que tiene el N° de acceso PTA-5933 en la ATCC.

La invención pretende capturar anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de distintos isotipos. Los hibridomas depositados producen anticuerpos del isotipo IgG2. Sin embargo, los genes de inmunoglobulina (Ig) recombinados, en particular los genes de la región variable, pueden aislarse de los hibridomas depositados, como se describe en los ejemplos, y clonarlos en un vector de recombinación de Ig que codifica los genes de la región constante de Ig humana de las cadenas ligera y pesada. Con esta técnica se han identificado, sintetizado y aislado los anticuerpos del isotipo IgG1 que se fijan a la PNAG/dPNAG estafilocócica y que, por este motivo, mejoran la opsonofagocitosis de las bacterias que expresan la PNAG (tales como los estafilococos).

Los anticuerpos pueden ser del isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE, IgM, IgA1, IgA2 o IgAs. La invención pretende capturar los isotipos hallados en las especies no humanas así como, pero sin limitarse a ellos, a IgY en los pájaros y tiburones. Se conocen y se han descrito anteriormente los vectores que codifican las regiones constantes de los distintos isotipos (véanse, por ejemplo, Preston et al. «Production and characterization of a set of mouse-human chimeric immunoglobulin G (IgG) subclass and IgA monoclonal antibodies with identical variable regions specific for *P. aeruginosa* serogroup O6 lipopolysaccharide». *Infect Immun.* de septiembre de 1998; 66(9): 4137-42; Coloma et al. «Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction». *J. Immunol Methods.* 31 de julio de 1992; 152(1): 89-104; Guttieri et al. «Cassette vectors for conversion of Fab fragments into full-length human IgG1 monoclonal antibodies by expression in stably transformed insect cells». *Hybrid Hybridomics* de junio de 2003; 22(3): 135-45; McLean et al. «Human and murine immunoglobulin expression vector cassettes». *Mol Immunol* de octubre de 2000; 37 (14): 837-45; Walls et al. «Vectors for the expression of PCR-amplified immunoglobulin variable domains with human constant regions». *Nucleic Acids Res.* 25 de junio de 1993; 21 (12): 2921-9; Norderhaug et al. «Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells». *J Immunol. Methods.* 12 de mayo de 1997; 204 (1): 77-87).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «péptido» incluye los anticuerpos monoclonales, funcionalmente activos y/o los fragmentos de anticuerpo equivalentes, y los péptidos y polipéptidos funcionalmente activos y/o equivalentes.

Los péptidos son péptidos aislados. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «péptidos aislados» significa que los péptidos están sustancialmente puros y están esencialmente libres de otras sustancias con las que se pueden encontrar en la naturaleza o en sistemas *in vivo* en un grado práctico y apropiado para el uso que se pretende darles. En particular, los péptidos son suficientemente puros y están suficientemente libres de otros constituyentes biológicos de sus células hospedadoras de tal modo que sean útiles en, por ejemplo, la producción de preparaciones farmacéuticas o la secuenciación. Ya que un péptido aislado puede estar mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, el péptido puede comprender sólo un pequeño porcentaje en peso de la preparación. No obstante, el péptido está sustancialmente puro porque se ha separado sustancialmente de las sustancias con las que puede estar asociado en los sistemas vivos.

Los péptidos se fijan a la PNAG y/o dPNAG, preferiblemente de una manera selectiva. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «fijación selectiva» y «fijación específica» se utilizan indistintamente para referirse a la capacidad que tiene el péptido para fijarse con mayor afinidad a la PNAG y/o dPNAG, y a fragmentos de las mismas, que los compuestos que no se obtienen de la PNAG. Es decir, los péptidos que se fijan selectivamente a la PNAG y/o dPNAG no se fijarán a los compuestos que no proceden de la PNAG con la misma intensidad ni con la misma afinidad que cuando se fijan a la PNAG y/o dPNAG y fragmentos de las mismas, con la excepción de los antígenos de reacción cruzada o las moléculas fabricadas para ser imitaciones de la PNAG/dPNAG, tales como péptidos que imitan a los glúcidos o las regiones variables de anticuerpos anti-idiotipo que se fijan a los péptidos de fijación a la PNAG/dPNAG del mismo modo que a la PNAG/dPNAG. Los anticuerpos que se fijan selectivamente a la PNAG se fijan a la PNAG con mayor afinidad que a la dPNAG. Los anticuerpos que se fijan a la dPNAG también pueden fijarse a la dPNAG con una afinidad menor, comparable o mayor que a la PNAG. En las realizaciones preferidas, los péptidos de la invención se fijan únicamente a la PNAG y/o dPNAG y fragmentos de las mismas, e incluso más preferiblemente, se fijan al menos a la dPNAG. Tal y como se utiliza en la presente memoria, un péptido de fijación que se fija selectivamente o específicamente a la PNAG/dPNAG estafilocócica también puede fijarse a la PNAG/dPNAG de otra procedencia y se fijará con menor afinidad (si es que se fija) a los compuestos que no proceden de la PNAG/dPNAG. Menor afinidad puede incluir al menos un 10% menos, 20% menos, 30% menos, 40% menos, 50% menos, 60% menos, 70% menos, 80% menos, 90% menos o 95% menos. Así pues, «selectivo» en este sentido se refiere a la fijación a la PNAG/dPNAG y no a la forma de PNAG/dPNAG procedente de los estafilococos.

Tal y como se mencionó inicialmente, la descripción da a conocer péptidos, p. ej., anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, que se fijan a la PNAG y/o dPNAG estafilocócica. Tales anticuerpos mejoran preferiblemente la opsonización y la fagocitosis (a saber, opsonofagocitosis) de las bacterias que expresan la PNAG (tales como los estafilococos que expresan la PNAG) y como resultado son útiles para la prevención y el tratamiento de algunas formas de infecciones bacterianas en un sujeto. La opsonización se refiere a un proceso mediante el cual se facilita la fagocitosis por la deposición de opsoninas (p. ej., anticuerpo y/o factores del complemento opsónicos tales como C4b o C3b o cualquier otro factor capaz de favorecer la opsonofagocitosis) en el antígeno. La fagocitosis y la opsonofagocitosis se refieren al proceso mediante el cual las células fagocíticas (p. ej., macrófagos, células dendríticas y leucocitos polimorfonucleados (PMNL, por su nombre en inglés) engullen el material y lo encierran dentro de una vacuola (p. ej., un fagosoma) del citoplasma. Así pues, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que opsonizan bacterias y mejoran la fagocitosis son anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que reconocen el antígeno y se depositan en él y, al hacerlo, facilitan la captación y el engullimiento del antígeno (y la sustancia que lleva el antígeno, p. ej., bacterias estafilocócicas) por las células fagocíticas. Por lo general, para mejorar la fagocitosis y la opsonización, el anticuerpo comprende un dominio o región Fc. El dominio Fc es reconocido por las células que llevan el receptor de Fc (p. ej., células presentadoras de antígeno tales como los macrófagos, o los PMNL). Tal y como se utiliza en la presente memoria, «estimular la opsonofagocitosis» significa incrementar la probabilidad de que un antígeno o un sustrato que lleva el antígeno sea reconocido y engullido por una célula fagocítica, mediante la deposición del anticuerpo. Esta mejora se puede medir mediante la reducción de la carga bacteriana *in vivo* o mediante la muerte de las células bacterianas *in vitro* con los procedimientos *in vitro* que se describen a continuación.

Los ensayos de opsonización son estándares en la técnica. Por lo general, tales ensayos miden la cantidad de muerte bacteriana en presencia de un anticuerpo, un antígeno (expresado sobre la célula bacteriana destinataria), complemento y células fagocíticas. El suero tanto de animales como de humanos se utiliza con frecuencia como fuente de complemento, y los linfocitos polimorfonucleados de los animales o de los humanos se utilizan habitualmente como fuente de células fagocíticas. La célula diana para la muerte por opsonofagocitosis puede ser procarionta (como en la presente invención) o eucariota, según qué tipo de célula expresa el antígeno. La muerte celular puede medirse mediante el recuento de las células viables antes y después de la incubación de los componentes de la reacción. Alternativamente, la muerte celular puede cuantificarse midiendo el contenido celular en el sobrenadante de la mezcla de reacción (p. ej., liberación del cromo radiactivo o liberación de enzimas intracelulares tales como la lactato deshidrogenasa). Otros ensayos resultarán evidentes para los expertos en la técnica, al haber leído la presente especificación, que son útiles para determinar si un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se fija a la PNAG y/o dPNAG estafilocócica también estimula la opsonización y la fagocitosis.

La presente invención o descripción da a conocer, entre otras cosas, anticuerpos monoclonales humanos específicos contra la PNAG/dPNAG que estimulan la muerte por opsonización de las bacterias que expresan la PNAG tal como, pero sin limitarse a ellos, los estafilococos. Estos anticuerpos se denominan F598, F628 y F630. Cuando se utilizan *in vivo* en los humanos, los anticuerpos monoclonales humanos es mucho menos probable que sean inmunógenos (en comparación con los anticuerpos de otras especies). Como resultado, estos anticuerpos representan nuevos agentes útiles para el diseño de vacunas así como para la inmunoterapia pasiva que se centra en las cepas bacterianas que expresan la PNAG tal como, pero sin limitarse a ellos, los estafilococos.

La síntesis de estos anticuerpos monoclonales se describe en los ejemplos. Brevemente, los anticuerpos se obtuvieron como sigue: los linfocitos B se recogieron de individuos que se estaban recuperando de una infección por estafilococos. Los linfocitos B recogidos se transformaron con el virus de Epstein-Barr y, tras un periodo de crecimiento y escrutinio para detectar los que secretan el anticuerpo contra PNAG/dPNAG, se fusionaron con la línea celular de mieloma de humano-ratón inmortalizado correspondiente denominada HMMA 2.5. Tras un periodo inicial de crecimiento de las células fusionadas, se aislaron los clones que producían un solo anticuerpo, se dejaron crecer y se analizaron por separado con un ensayo de fijación (p. ej., ELISA). Se seleccionaron tres hibridomas basándose en la capacidad que tenía el anticuerpo secretado para fijarse a la PNAG y/o dPNAG estafilocócica. Los tres anticuerpos eran del isotipo IgG2 y se utilizaron como fuente de anticuerpos de isotipo IgG2. Se clonaron por PCR las regiones variables de los hibridomas como se describe más arriba.

Los ácidos nucleicos de la región variable para las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos se clonaron en un vector de expresión de Ig humana (a saber, TCAE6) que contenía las secuencias codificantes de la región constante de IgG1 (γ 1) para la cadena pesada y la región constante de λ para las cadenas ligeras (véase, por ejemplo, Preston et al. «Production and characterization of a set of mouse-human chimeric immunoglobulin G (IgG) subclass and IgA monoclonal antibodies with identical variable regions specific for *P. aeruginosa* serogroup O6 lipopolysaccharide». *Infect. Immun.* de septiembre de 1998; 66 (9): 4137-42). Las regiones variables pueden colocarse en cualquier vector que codifique las secuencias que codifican la región constante. Por ejemplo, en Coloma et al, 1992, *J. Immunol. Methods*, 152: 89-104 se han descrito los vectores de expresión de la región constante de la cadena pesada de Ig humana que contienen clones genómicos de los genes de la región constante de la cadena pesada de IgG2, IgG3, IgG4 e IgA y que carecen de los genes de la región variable.

Estos vectores de expresión se transfectaron luego en las células (p. ej., células CHO DG44), se hicieron crecer las células *in vitro*, y se recogió posteriormente la IgG1 a partir del sobrenadante. Los anticuerpos resultantes poseían regiones variables humanas y regiones constantes de λ y de IgG1 humanas. Su capacidad para fijarse a la PNAG y/o la dPNAG y para mejorar la opsonización y la fagocitosis de las bacterias que expresan la PNAG, tales como los estafilococos, se evaluó mediante ensayos de muerte por opsonofagocitosis y de fijación, tales como los descritos en la presente memoria.

Los «anticuerpos aislados», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a los anticuerpos que están sustancialmente separados de forma física de otros materiales celulares (p. ej., separado de las células que producen los anticuerpos) o de otro material que dificulta su uso tanto en los procedimientos diagnósticos como en los terapéuticos de la invención. Preferiblemente, los anticuerpos aislados están presentes en una población homogénea de anticuerpos (p. ej., una población de anticuerpos monoclonales). Las composiciones de los anticuerpos aislados pueden, no obstante, combinarse con otros componentes tal como, pero sin limitarse a ellos, vehículos, adyuvantes y similares farmacéuticamente aceptables.

«Células aisladas que producen anticuerpos», entre ellas los hibridomas aislados y las células recombinantes aisladas (tales como las descritas en la presente memoria), tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a las células productoras de anticuerpos que están sustancialmente separadas de forma física de otras células, de otro material corporal (p. ej., tejido y líquido ascíticos) y de otros materiales que dificultan su uso para la producción de, por ejemplo, una población de anticuerpos aislada y preferiblemente homogénea. Los hibridomas depositados en la ATCC bajo el Tratado de Budapest como los N^o de acceso PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933 en la ATCC el 21 de abril de 2004 se consideran ejemplos de células aisladas productoras de anticuerpos y más en particular hibridomas aislados.

Por lo tanto, en una realización, el péptido es un anticuerpo monoclonal soluble intacto y aislado que es específico de la PNAG y/o dPNAG estafilocócica. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «anticuerpo monoclonal» se refiere a una población homogénea de inmunoglobulinas que se fijan específicamente al mismo epítipo (esto es, determinante antigénico). El péptido en una realización es, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que tiene una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 5. El anticuerpo monoclonal puede tener una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6. Los anticuerpos monoclonales que tienen cualquier combinación de regiones variables de las cadenas ligera y pesada están abarcados por la invención.

La descripción pretende abarcar otros anticuerpos además de, por ejemplo, los clones F598, F628 y F630, siempre y cuando tales anticuerpos tengan las características de fijación de los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria. Opcionalmente, estos otros anticuerpos también mejoran la opsonofagocitosis de las cepas

bacterianas que expresan la PNAG tales como, pero sin limitarse a ellos, los estafilococos que expresan la PNAG. El experto en la técnica puede identificar con facilidad los anticuerpos que tienen las características funcionales (p. ej., atributos de fijación, opsonización y fagocitosis) de estos anticuerpos monoclonales mediante los ensayos de escrutinio y de fijación presentados en detalle en la presente memoria.

- 5 En otras realizaciones, el péptido es un fragmento de anticuerpo. Como se sabe bien en la técnica, sólo una pequeña porción de una molécula de anticuerpo, el paratopo, está implicada en la fijación del anticuerpo a su epítipo (véanse, en general, Clark, W. R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc, Nueva York; Roitt, I (1991) *Essential Immunology*, 7ª ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford; y Pier G. B., Lyczak J. B., Wetzler L. M., (eds), *Immunology, Infection and Immunity* (2004), 1ª ed., American Society for
- 10 Microbiology Press, Washington D.C.). Las regiones pFc' y Fc del anticuerpo, por ejemplo, son efectoras de la cascada del complemento y pueden intervenir en la fijación a los receptores de Fc de las células fagocíticas, pero no intervienen en la fijación del antígeno. Un anticuerpo del cual la región pFc' se ha escindido enzimáticamente, o que se ha sintetizado sin la región pFc', designado como fragmento F(ab')₂, conserva los dos sitios de fijación al antígeno de un anticuerpo intacto. Un fragmento F(ab')₂ aislado se dice que es un fragmento monoclonal bivalente debido a
- 15 sus dos sitios de fijación al antígeno. De igual forma, un anticuerpo del cual se ha escindido enzimáticamente la región Fc, o que se ha sintetizado sin la región Fc, denominado fragmento Fab, conserva uno de los sitios de fijación al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Avanzando un poco más, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera del anticuerpo unida covalentemente a una porción de la cadena pesada del anticuerpo denominada Fd (región variable de la cadena pesada). Los fragmentos Fd son el principal determinante de la especificidad del
- 20 anticuerpo (un único fragmento Fd puede estar asociado con incluso diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo) y los fragmentos Fd conservan una vez aislados la capacidad de fijación al epítipo.

- La terminología Fab, Fc, pFc', F(ab')₂ y Fv se emplean con sus significados inmunológicos estándares correspondientes [Klein, *Immunology* (John Wiley, Nueva York, NY, 1982); Clark, W. R. (1986) *The Experimental Foundations of Modern Immunology* (Wiley & Sons, Inc., Nueva York); Roitt, I (1991) *Essential Immunology*, 7ª ed.,
- 25 (Blackwell Scientific Publications, Oxford); y Pier G. B., Lyczak J. B., Wetzler L. M., (eds). *Immunology, Infection and Immunity* (2004), 1.ª ed., American Society for Microbiology Press, Washington D.C.].

- En otras realizaciones, se pueden reemplazar las porciones Fc de los anticuerpos de la invención de modo que se produzcan anticuerpos de tipo IgM así como de tipo IgG humanos que llevan parte o todas las CDR de los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria o producidos por los hibridomas depositados con los N°
- 30 de acceso PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933 en la ATCC. Tiene una importancia particular la inclusión de una región CDR3 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica y, en menor medida, las otras CDR y porciones de las regiones flanqueantes de los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria o producidos por los hibridomas depositados con los N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933 en la ATCC. Tales anticuerpos humanos tendrán una utilidad clínica concreta porque reconocerán y se fijarán a, preferiblemente de forma selectiva, la PNAG
- 35 y/o la dPNAG estafilocócica, pero no provocarán una respuesta inmunitaria en los humanos contra el propio anticuerpo.

- La descripción también pretende incluir variantes funcionalmente equivalentes de los péptidos de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica. Una «variante funcionalmente equivalente» es un compuesto que tiene la misma función (a saber, la capacidad de fijarse a la PNAG y/o dPNAG estafilocócica y en algunas realizaciones facilitar la
- 40 opsonización de las cepas bacterianas que expresan la PNAG) que los péptidos de la invención. Una variante funcionalmente equivalente puede ser una de naturaleza peptídica, pero no se limita sólo a esto. Por ejemplo, puede ser un glúcido, un peptidomimético, etc. En las realizaciones importantes, la variante funcionalmente equivalente es un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una región variable o de una CDR con sustituciones conservativas en ella, que sigue siendo capaz de fijarse a la PNAG y/o dPNAG estafilocócica. Un ejemplo de una
- 45 variante funcionalmente equivalente de la CDR3 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica obtenida de la región variable de la cadena pesada del clon F598 (a saber, SEQ ID NO: 1) es un péptido que tiene sustituciones conservativas en la SEQ ID NO: 1 que se fija, preferiblemente de forma específica, a la PNAG y/o dPNAG estafilocócica y que, opcionalmente, mejora la opsonización de las cepas bacterianas que expresan la PNAG tal como los estafilococos que expresan la PNAG. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «sustitución
- 50 conservativa» se refiere a una sustitución de aminoácido que no altera las características de carga o tamaño relativo del péptido en el cual se realiza la sustitución del aminoácido. Las sustituciones conservativas de los aminoácidos incluyen sustituciones hechas entre los aminoácidos de los siguientes grupos: (1) M, I, L, V; (2) F, Y, W; (3) K, R, H; (4) A, G; (5) S, T; (6) Q, N; y (7) E, D.

- Las variantes funcionalmente equivalentes pueden tener una identidad con los péptidos que se citan explícitamente
- 55 en la presente memoria. Es decir, tales variantes pueden tener una identidad de al menos el 99%, identidad de al menos el 98%, identidad de al menos el 97%, identidad de al menos el 96%, identidad de al menos el 95%, identidad de al menos el 94%, identidad de al menos el 93%, identidad de al menos el 92%, identidad de al menos el 91%, identidad de al menos el 90%, identidad de al menos el 85%, identidad de al menos el 80%, identidad de al menos el 75%, identidad de al menos el 70%, identidad de al menos el 65%, identidad de al menos el 60%,
- 60 identidad de al menos el 55%, identidad de al menos el 50%, identidad de al menos el 45%, identidad de al menos el 40%, identidad de al menos el 35%, identidad de al menos el 30%, identidad de al menos el 25%, identidad de al

menos el 20%, identidad de al menos el 10% o identidad de al menos el 5% con las secuencias de aminoácidos dadas a conocer en la presente memoria.

- La equivalencia funcional se refiere a una actividad equivalente (p. ej., que se fija a la PNAG y/o dPNAG estafilocócica, o que mejora la opsonofagocitosis de las bacterias que expresan la PNAG, tales como los estafilococos que expresan la PNAG), aunque, también abarca la variación del nivel de tal actividad. Por ejemplo, un equivalente funcional es una variante que se fija a la PNAG y/o dPNAG estafilocócica con una afinidad menor, igual o mayor que los clones del anticuerpo monoclonal descritos en la presente memoria, siempre y cuando la variante siga siendo útil en la invención (a saber, se fija a la PNAG y/o dPNAG estafilocócica y opcionalmente mejora la opsonofagocitosis de las bacterias que expresan la PNAG, tal como los estafilococos que expresan la PNAG).
- 10 Tales sustituciones se pueden realizar mediante una serie de procedimientos conocidos por el experto en la técnica. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos mediante mutación dirigida por PCR, mutagénesis específica de sitio de acuerdo con el método de Kunkel (Kunkel, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 82: 488-492, 1985), o mediante síntesis química de un gen que codifica la CDR concreta o un péptido que comprende las secuencias de aminoácidos de las CDR descritas en la presente memoria. Éstos y otros procedimientos para alterar un péptido que contiene CDR lo conocerán bien los expertos en la técnica y pueden encontrarse en las referencias que recogen tales procedimientos, p. ej., Sambrook o Ausubel, señalados más arriba. Sin embargo, en algunas realizaciones, debido al tamaño de las CDR, puede ser más cómodo sintetizar los péptidos variantes en un sintetizador de péptidos tal como los disponibles en el comercio. La actividad de las variantes funcionalmente equivalentes de la CDR de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica puede comprobarse mediante ensayos de fijación y, en algunos casos, ensayos de actividad biológica, que se explican con más detalle a continuación. Tal y como se utiliza en la presente memoria, se utiliza indistintamente la terminología «variante funcional», «variante funcionalmente equivalente» y «variante funcionalmente activa».

- Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «fragmento de anticuerpo funcionalmente activo» significa un fragmento de una molécula de anticuerpo, que incluye una región de fijación a la PNAG o de fijación a la dPNAG estafilocócicas de la invención que conserva la capacidad para fijarse a la PNAG estafilocócica o a la dPNAG, respectivamente, preferiblemente de una manera específica. Tales fragmentos pueden utilizarse tanto *in vitro* como *in vivo*. En particular, los fragmentos de anticuerpo funcionalmente activos bien conocidos incluyen, pero sin limitarse a ellos, fragmentos de anticuerpo F(ab')₂, Fab, Fv y Fd. Estos fragmentos que carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan de la circulación con más rapidez, y pueden tener menos fijación inespecífica al tejido que un anticuerpo intacto (Wahl et al., *J. Nucl. Med.* 24: 316-325 (1983)). Como otro ejemplo, los anticuerpos de una sola cadena se pueden construir de acuerdo con los procedimientos descrito en la patente de los EE.UU. N° 4.946.778 de Landner et al. Tales anticuerpos monocatenarios incluyen las regiones variables de las cadenas pesada y ligera unidas por un resto conector flexible. También se han descrito procedimientos para obtener un anticuerpo con un único dominio («Fd») que comprende un dominio variable único y aislado de la cadena pesada (véase, por ejemplo, Ward et al., *Nature* 341: 644-646 (1989), que describe un s de escrutinio para identificar una región variable de la cadena pesada del anticuerpo (anticuerpo con un único dominio V_H) con suficiente afinidad por su epítipo diana que le permite fijarse a éste en forma aislada). En la técnica se conocen los procedimientos para fabricar fragmentos Fv recombinantes basándose en las secuencias conocidas de la región variable de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo y se han descrito, p. ej., en Moore et al., patente de los EE.UU. N° 4.462.334. Otras referencias que describen el uso y la generación de fragmentos de anticuerpos incluyen, p. ej., fragmentos Fab (Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays* (Elsevier, Amsterdam, 1985)), fragmentos Fv (Hochman et al., *Biochemistry* 12: 1130 (1973); Sharon et al., *Biochemistry* 15: 1591 (1976); Ehrlich et al., patente de los EE.UU. N° 4.355.023) y porciones de moléculas de anticuerpo (Audilore-Hargreaves, patente de los EE.UU. N° 4.470.925). Así pues, los expertos en la técnica pueden construir fragmentos de anticuerpo a partir de distintas porciones de anticuerpos intactos sin destruir la especificidad de los anticuerpos contra la PNAG y/o dPNAG estafilocócica.

- En aspectos importantes de la invención, el fragmento de anticuerpo funcionalmente activo también conserva la capacidad de opsonizar y fagocitar las bacterias que expresan la PNAG tal como los estafilococos que expresan la PNAG. En este último caso, el fragmento de anticuerpo incluye una región Fc así como un dominio de fijación al epítipo. La región Fc permite que el fragmento del anticuerpo se fije a las células que expresan el receptor Fc, que posteriormente fagocita el epítipo fijado por la región Fab del anticuerpo.

- Adicionalmente, los péptidos pequeños entre ellos los que contienen la región CDR3 de fijación a la PNAG/dPNAG estafilocócica pueden sintetizarse o producirse con facilidad mediante medios recombinantes para producir el péptido de la descripción. Tales procedimientos los conocen bien los expertos en la técnica. Los péptidos pueden sintetizarse, por ejemplo, con sintetizadores peptídicos automáticos que están disponibles en el comercio. Los péptidos pueden producirse mediante técnicas recombinantes al incorporar el ADN que expresa el péptido en un vector de expresión y luego transformar las células con el vector de expresión para producir el péptido.

- A los péptidos, entre ellos los anticuerpos, se les puede analizar su capacidad de fijación a la PNAG y/o dPNAG estafilocócica mediante los ensayos de fijación estándares conocidos en la técnica. Como ejemplo de un ensayo adecuado se pueden inmovilizar en una superficie (tal como en un pocillo de una placa multipocillo) la PNAG y/o la dPNAG, tal como la PNAG y/o dPNAG estafilocócica, y luego se ponen en contacto con un péptido marcado. La cantidad del péptido que se fija a la PNAG y/o a la dPNAG (y que, por tanto, se queda inmovilizado en la superficie)

puede cuantificarse luego para determinar si un péptido determinado se fija a la PNAG y/o a la dPNAG. Alternativamente, también puede medirse la cantidad de péptido que no se fija a la superficie. En una variación de este ensayo, se puede analizar la capacidad del péptido para fijarse directamente a una colonia que expresa la PNAG que se hizo crecer *in vitro*.

- 5 La fijación del péptido también puede ensayarse con un ensayo de competición. Si el péptido a analizar (incluido un anticuerpo) compete con los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos descritos en la presente memoria, como se demuestra con una disminución de la fijación del anticuerpo monoclonal o fragmento, entonces es probable que el péptido y el anticuerpo monoclonal se fijen al mismo epítipo, o al menos a un epítipo solapante. En este sistema de ensayo, el anticuerpo o fragmento del anticuerpo está marcado, y la PNAG y/o dPNAG está
- 10 inmovilizada sobre la superficie sólida. Estos y otros ensayos se describen con más detalle en la presente memoria. De este modo se pueden identificar los péptidos competidores, entre ellos los anticuerpos competidores. La descripción abarca los péptidos y en particular los anticuerpos (y fragmentos de los mismos) que compiten con los anticuerpos F598, F628 o F630 por la fijación a la PNAG/dPNAG (a saber, los anticuerpos que reconocen y se fijan a los mismos epítipos que F598, F628 o F630).
- 15 Los ensayos de fijación estándares se conocen bien en la técnica, y una serie de ellos son idóneos para la presente invención, entre ellos, ELISA, ensayo de fijación competitiva (como está descrito más arriba), ensayos en sándwich, ensayos radiorreceptores con péptidos marcados radiactivamente o anticuerpos radiomarcados, inmunoensayos, etc. La naturaleza del ensayo no es esencial siempre y cuando sea lo suficientemente sensible para detectar la fijación de un pequeño número de péptidos.

- 20 En la mezcla de fijación también se puede incluir otro gran número de reactivos. Estos incluyen reactivos tales como sales, tamponantes, proteínas neutras (p. ej., albúmina), detergentes, etc., que se pueden utilizar para facilitar la fijación óptima. Tal reactivo también puede reducir las interacciones inespecíficas o de fondo de los componentes de la reacción. También pueden utilizarse otros reactivos que mejoran la eficiencia del ensayo. La mezcla de los materiales de ensayo anteriores se incubaba en unas condiciones en las que el anticuerpo monoclonal normalmente se
- 25 fija de forma específica a la PNAG y/o dPNAG tal como la PNAG y/o dPNAG estafilocócica. Tales condiciones preferiblemente imitarán las condiciones fisiológicas. Se puede determinar con facilidad el orden de adición de los componentes, la temperatura de incubación, el tiempo de incubación y otros parámetros del ensayo. Tal experimentación simplemente implica la optimización de los parámetros del ensayo, no la composición fundamental del ensayo. La temperatura de incubación está típicamente entre los 4 °C y los 40 °C. El tiempo de incubación está
- 30 preferiblemente llevado al mínimo para facilitar el escrutinio rápido de gran rendimiento, y se sitúa típicamente entre 0,1 y 10 horas. Tras la incubación, la presencia o ausencia de fijación específica entre el péptido y la PNAG y/o dPNAG se detecta mediante cualquier procedimiento cómodo disponible para el usuario.

- Típicamente, se ejecutan en paralelo muchas mezclas de ensayo con diferentes péptidos o diferente concentración de los péptidos para obtener una respuesta diferente a las diferentes concentraciones. Una de estas
- 35 concentraciones sirve de control negativo, a saber, a una concentración 0 de la PNAG y/o dPNAG o a una concentración de PNAG y/o dPNAG por debajo del límite de detección del ensayo.

- A menudo se utiliza una etapa de separación para separar el péptido o anticuerpo fijado del que no está fijado. La etapa de separación puede llevarse a cabo de muchas maneras. Ventajosamente, al menos uno de los componentes (p. ej., péptido o anticuerpo) está inmovilizado en un sustrato sólido a través de la fijación a la PNAG
- 40 y/o la dPNAG. Los componentes sin fijar se pueden separar con facilidad de la fracción fijada. El sustrato sólido puede estar hecho de una amplia gama de materiales y con una amplia variedad de formas, p. ej., columnas o geles de poliacrilamida, agarosa o sefarosa, placas de microtitulación, microperlas, partículas de resina, etc. La etapa de separación preferiblemente incluye varios enjuagues o lavados. Por ejemplo, cuando el sustrato sólido es una placa de microtitulación, los pocillos pueden lavarse varias veces con una solución de lavado, que típicamente incluye los
- 45 componentes de la mezcla de incubación que no participan en las fijaciones específicas, tales como sales, tamponante, detergente, proteína inespecífica, etc. Cuando el sustrato sólido es una perla magnética, las perlas pueden lavarse una o varias veces con una solución de lavado y aislarlas con un imán.

- Los péptidos pueden utilizarse solos o en conjugados con otras moléculas tales como agentes de detección o
- 50 citotóxicos en los procedimientos de detección y tratamiento de la descripción, como se describe con más detalle en la presente memoria.

- Típicamente, uno de los componentes normalmente comprende, o está acoplado o conjugado, a un marcador detectable. Un marcador detectable es un resto cuya presencia puede averiguarse directa o indirectamente. Por lo general, la detección del marcador implica una emisión de energía desde el marcador. El marcador puede detectarse directamente por su capacidad para emitir y/o absorber fotones u otras partículas atómicas de una
- 55 longitud de onda determinada (p. ej., radioactividad, luminiscencia, densidad óptica o de electrones, etc.). Un marcador puede detectarse indirectamente por su capacidad para fijarse, reclutar y, en algunos casos, escindir otro resto que por sí solo puede emitir o absorber luz de una longitud de onda determinada (p. ej., una etiqueta de epítipo tal como el epítipo FLAG, etiqueta enzimática tal como la peroxidasa de rábano picante, etc.). Un ejemplo de detección indirecta es el uso de un primer marcador enzimático que escinde un sustrato en productos visibles. La
- 60 naturaleza de la molécula marcadora puede ser química, peptídica o de ácido nucleico, aunque no se limita solo a

ellas. Otros marcadores detectables incluyen isótopos radioactivos tales como ^{32}P o ^3H , marcadores luminiscentes tales como fluorocromos, marcadores de densidad electrónica u óptica, etc., o etiquetas de epítomos tales como el epítomo FLAG o el epítomo HA, biotina, avidina, y etiquetas enzimáticas tales como peroxidasa de rábano picante, la β -galactosidasa, etc. El marcador puede quedar fijado a un péptido durante o tras su síntesis. Hay muchos
 5 marcadores y procedimientos de marcación diferentes conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de los tipos de marcadores que pueden utilizarse en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Los expertos en la técnica conocerán otros marcadores adecuados para los péptidos descritos en la presente memoria o serán capaces de averiguarlos, mediante la experimentación convencional. Además, el acoplamiento o conjugación de
 10 estos marcadores a los péptidos de la descripción puede realizarse utilizando las técnicas estándares habituales de los expertos en la técnica.

Otra técnica de marcación que puede dar lugar a una mayor sensibilidad consiste en acoplar los péptidos a haptenos de bajo peso molecular. A continuación, estos haptenos se pueden alterar específicamente por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es habitual utilizar haptenos tales como la biotina, que reacciona con la avidina,
 15 o dinitrofenol, piridoxal o fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos anti-hapteno específicos.

La conjugación de los péptidos, entre ellos los anticuerpos o fragmentos de los mismos, a un marcador detectable facilita, entre otras cosas, el uso de tales agentes en ensayos diagnósticos. Otra categoría de marcadores detectables incluye marcadores de imagen y de diagnóstico (por lo general se denominan marcadores detectables *in vivo*) tal como, por ejemplo, resonancia magnética (RMN): Gd(DOTA); para medicina nuclear: ^{201}Tl , radionúclido
 20 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ emisor de γ ; para la tomografía de emisión de positrones (PET): isótopos emisores de positrones, (18)F-fluorodesoxiglucosa ((18)FDG), (18)F-fluoruro, ^{64}Cu , gadodiamida y radioisótopos de Pb(II) tal como ^{203}Pb ; ^{111}In .

Las conjugaciones o modificaciones descritas en la presente memoria emplean la química convencional, que no forma parte de la invención y que es bien conocida por los expertos en la técnica de la química. El uso de grupos protectores y conectores conocidos, tales como conectores mono- y heterobifuncionales, están bien documentado
 25 en la bibliografía y no se repetirá aquí.

Tal y como se usa en la presente memoria, «conjugado» se refiere a dos entidades que están enlazadas de forma estable entre sí por cualquier medio fisicoquímico. Es importante que la naturaleza de la conexión sea tal que no altere sustancialmente la eficacia de ninguna de las entidades. Teniendo estos parámetros en mente, se puede emplear cualquier enlace covalente o no covalente conocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones
 30 se prefiere el enlace covalente. La conjugación no covalente incluye interacciones hidrófobas, interacciones iónicas, interacciones de alta afinidad tales como la formación de complejos de biotina-avidina y de biotina-estreptavidina, y otras interacciones de afinidad. Tales medios y procedimientos de conexión los conocen bien los expertos en la técnica.

Se pueden usar una amplia gama de procedimientos para detectar el marcador, según la naturaleza del marcador y de los otros componentes del ensayo. Por ejemplo, el marcador puede detectarse mientras está fijado al sustrato sólido o tras la separación del sustrato sólido. Los marcadores pueden detectarse directamente mediante densidad óptica o electrónica, emisiones radioactivas, transferencias de energía no radiactivas, etc., o detectarse indirectamente con anticuerpos conjugados, conjugados de estreptavidina-biotina, etc. Los procedimientos para detectar los marcadores se conocen bien en la técnica.
 35

Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria también pueden utilizarse para producir anticuerpos antiidiotípicos que pueden utilizarse para escrutar e identificar otros anticuerpos que tengan la misma especificidad de fijación que los anticuerpos monoclonales de la invención. Un anticuerpo antiidiotípico es un anticuerpo que reconoce los determinantes exclusivos que están presentes en un anticuerpo monoclonal de la invención. Estos determinantes están ubicados en la región hipervariable del anticuerpo. Esta región se fija a un epítomo determinado y, por consiguiente, es responsable de la especificidad del anticuerpo. Tales anticuerpos antiidiotípicos pueden producirse mediante las técnicas de hibridoma bien conocidas (Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495, 1975). Como ejemplo se puede preparar un anticuerpo antiidiotípico mediante la inmunización de un sujeto con el anticuerpo monoclonal. El sujeto inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo monoclonal inmunizante y producirá un anticuerpo contra estos determinantes idiotípicos. Mediante la utilización de
 40 los anticuerpos antiidiotípicos del animal inmunizado, que son específicos del anticuerpo monoclonal de la invención, es posible identificar otros clones con el mismo idiotipo que el anticuerpo monoclonal utilizado para la inmunización. La identidad idiotípica entre los anticuerpos monoclonales de las dos líneas celulares demuestra que los dos anticuerpos monoclonales son iguales respecto a que reconocen el mismo determinante epitópico. Así pues, mediante la utilización de anticuerpos antiidiotípicos se puede identificar otros hibridomas que expresan anticuerpos monoclonales que tienen la misma especificidad epitópica. La invención pretende abarcar todos los tipos anticuerpos
 45 anteriores.
 50
 55

Los anticuerpos antiidiotípicos también pueden utilizarse para la inmunización activa (Herlyn et al., *Science*, 232: 100, 1986) dado que es posible utilizar la tecnología antiidiotipo para producir anticuerpos monoclonales que imitan un epítomo. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal antiidiotípico fabricado contra un primer anticuerpo monoclonal
 60 tendrá un dominio de fijación en la región hipervariable que es la imagen del epítomo fijado por el primer anticuerpo

monoclonal. Así pues, el anticuerpo monoclonal antiidiotípico puede utilizarse para la inmunización, ya que el dominio de fijación al anticuerpo monoclonal antiidiotípico actúa con eficacia a modo de antígeno.

La invención además contempla los anticuerpos biespecíficos que incluyen un primer dominio de fijación al antígeno específico de PNAG/dPNAG y un segundo dominio de fijación al antígeno específico de otro resto. El primer dominio de fijación al antígeno que es específico de la PNAG/dPNAG puede comprender cualquiera de los péptidos de fijación a la PNAG/dPNAG (entre ellos, las CDR, las regiones variables, los fragmentos Fab descritos en la presente memoria o producidos o procedentes de los hibridomas depositados que tienen los N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933 en la ATCC). El segundo dominio de fijación al antígeno puede ser específico de un resto sobre una célula, tal como una célula bacteriana o una célula hospedadora. Las células hospedadoras pueden ser células del sistema inmunitario o células de tejido infectado. Los anticuerpos contra las moléculas de la superficie celular expresadas por las células del sistema inmunitario o de diferentes células de tejido del hospedador están por lo general disponibles en el mercado de compañías tales como Sigma o BD Biosciences Pharmingen. Los expertos en la técnica serán capaces de generar tales anticuerpos biespecíficos basándose en las enseñanzas de la presente memoria y el conocimiento de la técnica. De manera similar, la invención contempla también los anticuerpos triespecíficos (véase, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. N° 5.945.311 y 6.551.592 para la generación de anticuerpos biespecíficos y triespecíficos).

Se han determinado las secuencias responsables de la especificidad de los anticuerpos monoclonales de la invención. En consonancia, los péptidos de acuerdo con la invención pueden prepararse mediante la tecnología de ADN recombinante. Hay entidades en los Estados Unidos que realizarán esta función de forma comercial, tal como la Universidad de Thomas Jefferson y la Scripps Protein and Nucleic Acids Core Sequencing Facility (La Jolla, California). Por ejemplo, el ADNc de la región variable puede prepararse mediante la reacción de la cadena polimerasa a partir del ARN del hibridoma depositado utilizando cebadores degenerados o sin degenerar (deducidos de la secuencia de aminoácidos). El ADNc se puede subclonar para producir cantidades suficientes de ADN bicatenario para la secuenciación mediante reacciones o equipamiento de secuenciación convencionales.

Con el conocimiento de las secuencias del ácido nucleico de los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal contra la PNAG/dPNAG estafilocócica, el experto en la técnica es capaz de producir ácidos nucleicos que codifican este anticuerpo o que codifican los diferentes fragmentos de anticuerpo, anticuerpos humanizados o polipéptidos descritos más arriba. Se contempla que tales ácidos nucleicos estarán operativamente unidos a otros ácidos nucleicos para formar un vector recombinante para la clonación o la expresión de los péptidos de la invención. La presente invención incluye a todo vector recombinante que contiene las secuencias codificantes, o partes de las mismas, bien para la transformación, transfección o genoterapia procariota o eucariota. Tales vectores pueden prepararse mediante técnicas de biología molecular convencionales, conocidas por los expertos en la técnica, y comprenderían secuencias que codifican el ADN para la región CDR (y preferiblemente la región CDR3) y secuencias variables adicionales que contribuyen a la especificidad de los anticuerpos o de partes de los mismos, así como otras secuencias peptídicas inespecíficas y un promotor adecuado, en los que una secuencia señala para la exportación o para la secreción estará presente (Whittle et al., *Protein Eng.* 1: 499, 1987 y Burton et al., *Science* 266: 1024-1027, 1994) o ausente (Marasco et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 7889, 1993 y Duan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:5075-5079, 1994). Tales vectores se pueden introducirse por transformación o transfección en las células procariotas (Huse et al., *Science*, 246: 1275, 1989, Ward et al., *Nature*, 341: 644-646, 1989; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581, 1991 y Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (EE.UU) 88: 7978, 991) o eucariotas (Whittle et al., 1987 y Burton et al., 1994) o utilizarse para la genoterapia (Marasco et al., 1993 y Duan et al., 1994) mediante técnicas convencionales, conocidas por los expertos en la técnica.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, un «vector» puede ser cualquiera de una serie de ácidos nucleicos en los cuales se puede insertar una secuencia deseada mediante restricción y ligación para el transporte entre diferentes contextos genéticos o para la expresión en una célula hospedadora. Los vectores están compuestos típicamente de ADN, aunque también están disponibles los vectores de ARN. Los vectores incluyen, pero sin limitarse a ellos, plásmidos y fagémidos. Un vector de clonación es el que es capaz de replicarse en una célula hospedadora, y que además se caracteriza por tener uno o más sitios de restricción para endonucleasas en los cuales el vector puede cortarse de una forma determinada y en el cual puede ligarse una secuencia de ADN deseada, de tal forma que el nuevo vector recombinante conserva su capacidad para replicarse en la célula hospedadora. En el caso de los plásmidos, la replicación de la secuencia deseada puede producirse muchas veces a medida que el plásmido incrementa su número de copias dentro de la bacteria hospedadora, o sólo una vez por hospedador antes de que el hospedador se reproduzca por mitosis. En el caso del fago, la replicación puede producirse activamente durante una fase lítica o pasivamente durante una fase lisogénica. Un vector de expresión es aquél en el que una secuencia de ADN deseada puede insertarse mediante restricción y ligación de tal forma que queda unido operativamente a las secuencias reguladoras y puede expresarse como un transcrito de ARN. Los vectores pueden contener además una o más secuencias marcadoras adecuadas para el uso en la identificación de las células que se han, o no se han, transformado o transfectado con el vector. Los marcadores incluyen, por ejemplo, genes que codifican proteínas que incrementan o disminuyen o bien la resistencia o bien sensibilidad a los antibióticos o a otros compuestos, genes que codifican enzimas cuya actividad es detectable mediante ensayos estándares conocidos en la técnica (p. ej., β -galactosidasa o fosfatasa alcalina) y genes que afectan visiblemente al fenotipo de las células, hospedadores, colonias o placas transformadas o transfectadas. Los vectores preferidos son

los capaces de replicarse autónomamente y de expresar los productos génicos estructurales presentes en los segmentos de ADN a los cuales están operativamente unidos.

- Los vectores de expresión de la presente invención incluyen secuencias reguladoras unidas operativamente a una secuencia nucleotídica que codifica uno de los péptidos de la invención. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «secuencias reguladoras» significa secuencias nucleotídicas que son necesarias para, o que conducen a, la transcripción de una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido deseado y/o que son necesarias para, o que conducen a, la traducción de los transcritos resultantes en el polipéptido deseado. Las secuencias reguladoras incluyen, pero sin limitarse a ellas, secuencias en 5' tales como operadores, promotores y secuencias de unión de los ribosomas, y secuencias en 3' tales como las señales de poliadenilación. Los vectores de la invención pueden incluir opcionalmente secuencias señal o secuencias líder en 5', secuencias en 5' o 3' que codifican productos de fusión para ayudar en la purificación de las proteínas, y diferentes marcadores que ayudan a identificar o seleccionar los transformantes. La elección y el diseño de un vector adecuado se encuentra dentro de la capacidad y discreción del experto en la técnica. La posterior purificación de los péptidos puede llevarse a cabo mediante cualquiera de un conjunto de medios estándares conocidos en la técnica.
- 5 Un vector preferido para escrutar péptidos, pero no necesariamente preferido para la producción masiva de los péptidos de la invención, es una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia nucleotídica que codifica, y que es capaz de expresar, un polipéptido de fusión que contiene, en la dirección del extremo amino al carboxilo, (1) un dominio de señal de secreción procariota, (2) un polipéptido de la invención y, opcionalmente, (3) un dominio de proteína de fusión. El vector incluye secuencias reguladoras de ADN para expresar el polipéptido de fusión, preferiblemente secuencias reguladoras procariotas. Tales vectores los pueden construir los expertos en la técnica y han sido descritos por Smith et al. (*Science*, 228: 1315-1317, 1985), Clackson et al. (*Nature*, 352: 624-628, 1991); Kang et al. (en *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*: Vol 2, R. A. Lerner y D. R. Burton, ed., Academic Press, NY, páginas 111-118, 1991); Barbas et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7978-7982, 1991), Roberts et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2429-2433, 1992).
- 10 Un polipéptido de fusión puede ser útil para la purificación de los péptidos de la invención. El dominio de fusión puede, por ejemplo, incluir una cola de poli-His que permite la purificación en columnas de Ni²⁺, o la proteína de fijación a la maltosa del vector pMAL disponible comercialmente (New England BioLabs, Beverly, MA). Un dominio de fusión actualmente preferido, pero en ningún modo necesario, es una ancla a la membrana de fago filamentoso. Este dominio es particularmente útil para escrutar genotecas de exposición de anticuerpos monoclonales en fagos, pero puede tener menos utilidad para la producción en masa de los anticuerpos. El ancla a la membrana de fago filamentoso es preferiblemente un dominio de la proteína de la cubierta cpIII o cpVIII capaz de asociarse a la matriz de una partícula de fago filamentoso, por lo que se incorpora el polipéptido de fusión a la superficie del fago, lo que permite la fijación en fase sólida a antígenos o epítomos específicos y, por tanto, permite el enriquecimiento y la selección de los anticuerpos específicos o fragmentos codificados por el vector fagémido.
- 15 La señal de secreción es un dominio de péptido líder de una proteína que se dirige la proteína a la membrana de la célula hospedadora, tal como la membrana periplásmica de las bacterias gramnegativas. Una señal de secreción preferida para *E. coli* es una señal de secreción de pelB. Las secuencias de los residuos de aminoácidos predichos del dominio de la señal de secreción de las variantes que producen el gen *pelB* de *Erwinia carotova* se describen en Lei et al. (*Nature* 381: 543-546, 1988). La secuencia líder de la proteína pelB se ha utilizado previamente como una señal de secreción para las proteínas de fusión (Better et al., *Science*, 240: 1041-1043, 1988; Sastry et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5728-5732, 1989; y Mullinax et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8095-8099, 1990). Las secuencias de restos de aminoácidos de otros dominios polipeptídicos de señal de secreción de *E. coli* útiles en esta invención se pueden encontrar en Oliver, en Neidhard, F. C. (ed), *Escherichia coli and Salmonella Typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1: 56-69 (1987).
- 20 Para conseguir unos niveles altos de expresión génica en *E. coli*, es necesario utilizar no sólo promotores fuertes que generen grandes cantidades de ARNm, sino también sitios de fijación de ribosomas para garantizar que el ARNm se traduce con eficacia. En *E. coli*, el sitio de fijación del ribosoma incluye un codón de inicio (AUG) y una secuencia de 3 a 9 nucleótidos de largo ubicada 3 a 11 nucleótidos por delante del codón de inicio (Shine et al., *Nature*, 254: 34, 1975). La secuencia, AGGAGGU, que se denomina la secuencia de Shine-Dalgarno (SD), es complementaria al extremo 3' del ARNr 16S de *E. coli*. La fijación del ribosoma al ARNm y la secuencia del extremo 3' del ARNm pueden verse afectadas por varios factores: (i) el grado de complementariedad entre la secuencia de SD y el extremo 3' del ARNr 16S; (ii) el espaciado y posiblemente la secuencia de ADN que está entre la secuencia de SD y el AUG (Roberts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 760, 1979a; Roberts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5596, 1979b; Guarente et al., *Science* 209: 1428, 1980; y Guarente et al., *Cell*, 20: 543, 1980). La optimización se consigue midiendo el nivel de expresión de los genes en plásmidos en los cuales este espaciado se altera sistemáticamente. La comparación de los diferentes ARNm muestra que hay secuencias estadísticamente preferidas desde las posiciones -20 a +13 (donde la A del AUG es la posición 0) (Gold et al., *Annu. Rev. Microbiol.* 35: 365, 1981). Se ha demostrado que las secuencias líder influyen considerablemente en la traducción (Roberts et al., 1979a, b *supra*); y (iii) la secuencia nucleotídica tras el AUG, que afecta a la fijación del ribosoma (Taniguchi et al., *J. Mol. Biol.*, 118: 533, 1978).
- 50
- 55
- 60

Las secuencias reguladoras en 3' definen al menos un codón de terminación (parada) en fase y operativamente unido al polipéptido de fusión heterólogo.

En las realizaciones preferidas con un hospedador de expresión procariota, el vector utilizado incluye un origen de replicación o replicón procariota, a saber, una secuencia de ADN que tiene la capacidad de dirigir la replicación autónoma y el mantenimiento de la molécula de ADN recombinante de forma extracromosómica en una célula hospedadora procariota, tal como una célula hospedadora bacteriana, transformada con ello. Tales orígenes de replicación se conocen bien en la técnica. Los orígenes de replicación preferidos son los que son eficientes en el organismo hospedador. Una célula hospedadora preferida es *E. coli*. Para el uso de un vector en *E. coli*, un origen de replicación preferido es ColE1, que se encuentra en el pBR322 y en una gran diversidad de plásmidos de uso frecuente. También se prefiere el origen de replicación p15A hallado en el pACYC y sus derivados. Los replicones ColE1 y p15A se han utilizado con mucha frecuencia en la biología molecular, están disponibles en un muchos plásmidos y se describen en Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2.^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Además, las realizaciones que incluyen un replicón procariota incluyen preferiblemente también un gen cuya expresión confiere una ventaja selectiva, tal como resistencia farmacológica, a un hospedador bacteriano transformado con éste. Los genes de resistencia farmacológica bacterianos típicos son los que confieren resistencia a ampicilina, tetraciclina, neomicina/kanamicina o cloranfenicol. Los vectores también contienen típicamente sitios de restricción cómodos para la inserción de secuencias de ADN traducibles. Los vectores de ejemplo son los plásmidos pUC18 y pUC19, y los vectores derivados de ellos tales como pcDNAII disponible de Invitrogen (San Diego, CA).

Cuando el péptido de la invención es un anticuerpo que incluye las secuencias de la cadena ligera y de la cadena pesada, estas secuencias pueden estar codificadas en vectores independientes o, más ventajosamente, expresarse desde un único vector. La cadena ligera y la cadena pesada pueden, después de la traducción o después de la secreción, formar la estructura heterodimérica de las moléculas de anticuerpos naturales. Tal anticuerpo heterodimérico puede estar o no estabilizado mediante puentes disulfuro entre las cadenas ligera y pesada.

Un vector para la expresión de anticuerpos heterodiméricos, tales como los anticuerpos intactos de la invención o los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂, Fab o Fv de la invención, es una molécula de ADN recombinante adaptada para recibir y expresar la primera y segunda secuencias de ADN traducibles. Es decir, un vector de expresión de ADN para expresar un anticuerpo heterodimérico proporciona un sistema para clonar (insertar) independientemente las dos secuencias de ADN traducibles en dos casetes independientes presentes en el vector, para formar dos cistrones independientes para la expresión del primer y segundo polipéptidos de un anticuerpo heterodimérico. El vector de expresión de ADN para la expresión de dos cistrones se denomina vector de expresión dicistrónico.

Preferiblemente, el vector comprende un primer casete que incluye secuencias reguladoras de ADN en 5' y en 3' unidas operativamente mediante una secuencia de nucleótidos adaptada para la ligación direccional a un ADN a insertar. La secuencia traducible en 5' codifica preferiblemente la señal de secreción como se describe más arriba. El casete incluye secuencias reguladoras de ADN para expresar el primer polipéptido de anticuerpo que se produce cuando una secuencia de ADN traducible a insertar (ADN insertado) se inserta direccionalmente en el casete mediante la secuencia de nucleótidos adaptada para la ligación direccional.

El vector de expresión dicistrónico también contiene un segundo casete para expresar el segundo polipéptido de anticuerpo. El segundo casete incluye una segunda secuencia de ADN traducible que codifica preferiblemente una señal de secreción, como se describe más arriba, unida operativamente a su extremo 3' mediante una secuencia de nucleótidos adaptada para la ligación direccional a una secuencia de ADN cadena abajo del vector que típicamente define al menos un codón de parada en el marco de lectura del casete. La segunda secuencia de ADN traducible se une operativamente en su extremo 5' a las secuencias reguladoras de ADN que forman los elementos en 5'. El segundo casete es capaz, tras la inserción de una secuencia de ADN traducible (ADN insertado), de expresar el segundo polipéptido de fusión que comprende una señal de secreción con un polipéptido codificado por el ADN insertado.

Los péptidos de la presente descripción también pueden producirse en células eucariotas tales como las células CHO, hibridomas humanos, células linfoblastoides B inmortalizadas y similares. En este caso, se construye un vector en el cual las secuencias reguladoras eucariotas están operativamente unidas a las secuencias nucleotídicas que codifican el péptido. El diseño y la selección de un vector eucariota adecuado se encuentra dentro de la capacidad y discreción del experto en la técnica. La posterior purificación de los péptidos puede cumplirse mediante cualquiera de una serie de medios estándares conocidos en la técnica.

En otra realización, la presente invención da a conocer células hospedadoras, tanto procariotas como eucariotas, transformadas o transfectadas con, y que por lo tanto incluyen, los vectores de la presente invención.

Tal y como se utiliza en la presente memoria con respecto a los ácidos nucleicos, la terminología «aislado» significa: (i) amplificado *in vitro* mediante, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (ii) producido recombinantemente mediante clonación; (iii) purificado, como por escisión y separación en gel; o (iv) sintetizado mediante, por ejemplo, síntesis química. Un ácido nucleico aislado es aquél que es fácilmente manipulable mediante

- técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Así pues, se considera aislada una secuencia nucleotídica contenida en un vector en la cual se conocen los sitios de restricción en 5' y 3' o para la cual se han descrito secuencias de cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero una secuencia de ácido nucleico que existe en un estado nativo en su hospedador natural no se considera aislada. Un ácido nucleico aislado
- 5 puede estar sustancialmente purificado, pero no es necesario que lo esté. Por ejemplo, un ácido nucleico que está aislado dentro de un vector de clonación o de expresión no es puro por el hecho de que puede comprender sólo un pequeño porcentaje del material de la célula en la que reside. Tal ácido nucleico está aislado, no obstante, según se utiliza la terminología dentro de la presente memoria porque es fácilmente manipulable mediante las técnicas estándares conocidas por los expertos en la técnica.
- 10 Tal y como se utiliza en la presente memoria, una secuencia codificante y las secuencias reguladoras se dice que están «unidas operativamente» cuando están unidas covalentemente de tal modo que tiene lugar la expresión o transcripción de la secuencia codificante bajo la influencia o el control de las secuencias reguladoras. Se desea que las secuencias codificantes se traduzcan en una proteína funcional, dos secuencias de ADN se dice que están unidas operativamente si la inducción de un promotor en las secuencias reguladoras en 5' da lugar a la transcripción
- 15 de la secuencia codificante y si la naturaleza del enlace entre las dos secuencias de ADN no (1) da lugar a la introducción de una mutación por cambio de fase, (2) interfiere con la capacidad que tiene la región promotora para dirigir la transcripción de las secuencias codificantes, o (3) interfiere con la capacidad que tiene el transcrito de RNA correspondiente para traducirse en una proteína. Por lo tanto, una región promotora estaría unida operativamente a una secuencia codificante si la región del promotor fuera capaz de efectuar la transcripción de esa secuencia de
- 20 ADN de tal forma que el transcrito resultante se podría traducir en la proteína o polipéptido deseado.

La naturaleza precisa de las secuencias reguladoras necesarias para la expresión génica puede variar entre las especies o los tipos celulares, pero en general deberá incluir, cuando sea necesario, secuencias en 5' que no se transcriben y secuencias en 5' que no se traducen implicadas con el inicio de la transcripción y de la traducción, respectivamente, tal como una caja TATA, secuencia de adición de la caperuza, secuencia CAAT y similares. En particular, tales secuencias reguladoras en 5' que no se transcriben incluirán una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del gen unido operativamente. Las secuencias reguladoras pueden también incluir secuencias potenciadoras o secuencias activadoras cadena arriba, si fuera necesario.

La descripción también pretende abarcar el uso de los péptidos descritos en la presente memoria en procedimientos *in vivo* e *in vitro*. Los procedimientos de la descripción son útiles para el diagnóstico así como para tratar las infecciones por bacterias que expresan la PNAG tal como infecciones estafilocócicas. «Estafilococos», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a todas las especies bacterianas estafilocócicas que expresan el antígeno de PNAG. Las bacterias que se clasifican como estafilococos son bien conocidas por los expertos en la técnica y están descritas en la bibliografía de la microbiología. Los estafilococos que expresan la PNAG incluyen, pero sin limitarse a ellos, *Staphylococcus epidermidis* (incluidos RP62A (Nº 35984 en la ATCC), RP12 (Nº 35983 en la ATCC)

30 y M187), *Staphylococcus aureus* (incluidos RN4220 (pCN27) y el mucoide MN8) y cepas tales como *Staphylococcus carnosus* transformadas con los genes del locus *ica* (que incluye TM300 (pCN27)). Otras cepas bacterianas que expresan la PNAG de forma natural llevan o están transformadas con el locus *pga*. Los ejemplos incluyen *E. coli*, *Yersinia pestis* (*Y. pestis*), *Y. enterocolitica*, *Xanthomonas axonopodis*, *Pseudomonas fluorescens* (todas ellas son especies secuenciadas que llevan el locus *pgaABCD* completo) y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *A. pleuropneumoniae*, *Ralstonia solanacearum* (p. ej., forma megaplasmídica), *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*. Los expertos en la técnica serán capaces de identificar con facilidad otras cepas bacterianas que expresan la PNAG. Por ejemplo, las bacterias que llevan el locus *ica* o *pga* pueden producir la PNAG. El experto en la técnica puede escrutar con facilidad la expresión del ARNm o de la proteína relacionada con el locus *ica* o *pga*, ya que se conocen las secuencias del ácido nucleico de locus *ica* o *pga* (descritas en Heilmann, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom, D. Mack y F. Gotz (1996) «Molecular basis of intercellular in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*». *Molec. Microbiol.* 20: 1083 para *S. epidermidis*, y en Cramton S. E., Gerke C., Schnell N. F., Nichols W. W., Gotz F. «The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation». *Infect. Immun.* Octubre de 1999; 67 (10): 5427-33 para *S. aureus*; Blattner, F. R., G. Plunkett III, C. A. Bloch, N. T. Pema, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau y Y. Shao, 1997. «The complete genome secuencia de *Escherichia coli* K-12». *Science* 277: 1453-1474. Los genes descritos por Blattner et al. se denominaron *ycdSRQP* en su artículo y se renombraron *pgaABCD* en Wang et al., *J. Bacteriology*, mayo de 2004, página 2724-2734, vol. 186, Nº 9). Adicionalmente, la cápsula de las cepas bacterianas puede aislarse y analizarse mediante cromatografía líquida y espectroscopia de masas.

55 Los procedimientos de detección o diagnóstico dados a conocer por la invención suelen implicar poner en contacto uno o más péptidos de la invención en un sujeto o en una muestra del mismo. Preferiblemente, la muestra primero se recoge del sujeto, aunque también se contemplan procedimientos de detección *in vivo*. La muestra puede incluir cualquier tejido o líquido corporal que se sospeche que contiene la bacteria. Por ejemplo, una infección por estafilococos puede producirse esencialmente en todos los tejidos, órganos o líquidos del cuerpo humano, pero se encuentran con más frecuencia infectando la piel, huesos, articulaciones, pulmones y sangre. Una infección por *E. coli* puede producirse, por ejemplo, en las vías genitourinarias así como en otros tejidos y ubicaciones. La infección por *Y. pestis* es la causa de la peste bubónica en la piel y la peste pulmonar en el pulmón. La infección por *B. pertussis* ocasiona tos ferina en las vías respiratorias. Fundamentalmente, se puede analizar la presencia de la

bacteria en cualquier líquido, tejido u órgano del cuerpo, tal como piel, hueso, articulaciones, pulmones, mucosas tal como el esputo y la sangre.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «tratamiento» se refiere a la administración de péptidos a un sujeto con el propósito de lograr un beneficio médicamente deseable. Por consiguiente, «tratamiento» pretende abarcar los procedimientos del tratamiento «profiláctico» y «terapéutico». Los procedimientos de tratamiento profiláctico se refieren al tratamiento administrado a un sujeto antes del diagnóstico de una infección (tal como una infección por estafilococos). Es decir, el sujeto no presenta síntomas de una infección (tal como una infección por estafilococos) aunque el sujeto puede correr el riesgo de padecerla. Los procedimientos de tratamiento terapéutico se refieren al tratamiento administrado a un sujeto tras el diagnóstico de una infección (tal como una infección por estafilococos). Es decir, al sujeto se le ha diagnosticado una infección (tal como una infección por estafilococos) o alternativamente, el sujeto puede mostrar síntomas asociados a tal infección.

Los anticuerpos de la invención contra la PNAG/dPNAG son útiles para inducir la inmunización pasiva en un sujeto para prevenir o limitar el desarrollo de la infección sistémica y de la enfermedad en los sujetos que corren el riesgo quedar expuestos a agentes infecciosos. El procedimiento para inducir la inmunidad pasiva contra la infección por bacterias que expresan la PNAG, tales como estafilococos tales como *S. aureus*, se realiza mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo contra la PNAG/dPNAG (p. ej., uno que ocasiona la opsonización de los estafilococos, tal como *S. aureus*) a un sujeto. «Inmunidad pasiva», tal y como se utiliza en la presente memoria, implica la administración de anticuerpos a un sujeto, en donde los anticuerpos se han producido en un sujeto diferente (incluidos los sujetos de la misma o diferente especie), de tal forma que los anticuerpos se pegan la superficie de las bacteria y ocasionan la fagocitosis de la bacterias.

El anticuerpo contra la PNAG/dPNAG se puede administrar a cualquier sujeto que corre el riesgo de sufrir una infección por bacterias que expresan la PNAG (p. ej., infección por estafilococos que expresan la PNAG) para inducir la inmunidad pasiva y, en algunas realizaciones, se puede adaptar particularmente a sujetos incapaces de inducir la inmunidad activa contra la PNAG y/o la dPNAG. Un sujeto que es incapaz de inducir una respuesta inmunitaria es un sujeto inmunocomprometido (p. ej., paciente que se somete a quimioterapia, paciente con sida, etc.) o un sujeto que todavía no ha desarrollado un sistema inmunitario (p. ej., un recién nacido prematuro).

Un «sujeto», tal y como se utiliza en la presente memoria, es un mamífero homeotermo e incluye, pero sin limitarse a ellos, humanos, primates, animales agrícolas tales como caballos, vacas, cerdos, cabras, ovejas y pollos, y animales domésticos tales como perros y gatos. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto que no es un roedor. Un sujeto que no es un roedor es cualquier sujeto como está definido anteriormente, pero específicamente se descartan los roedores tales como los ratones, ratas y conejos. En algunas realizaciones, el sujeto preferido es un humano. En algunos casos, el sujeto puede ser uno que ha recibido o recibirá una prótesis tal como un reemplazo de cadera o rodilla, ya que tales dispositivos son especialmente propensos a la colonización por las bacterias. Tal y como se menciona en la presente memoria, en algunos aspectos de la invención se da a conocer también la detección y el tratamiento de infecciones vegetales.

El anticuerpo de la invención contra la PNAG/dPNAG se administra al sujeto en una cantidad eficaz para inducir inmunidad contra las bacterias que expresan la PNAG (p. ej., estafilococos tal como *S. aureus*). Una «cantidad eficaz para inducir inmunidad contra las bacterias que expresan la PNAG» es una cantidad de anticuerpo contra la PNAG/dPNAG que es suficiente para (i) impedir que la infección por tales bacterias se produzca en un sujeto que está expuesto a tales bacterias; (ii) inhibir el desarrollo de la infección, esto es, detener o enlentecer su desarrollo; y/o (iii) aliviar los efectos de la infección, esto es, reducción de la carga bacteriana o erradicación completa de las bacterias en los sujetos infectados. Como ejemplo, una «cantidad eficaz para inducir inmunidad contra los estafilococos» tal y como se utiliza en la presente memoria es una cantidad de anticuerpo contra la PNAG/dPNAG que es suficiente para (i) prevenir que la infección por estafilococos se produzca en un sujeto que está expuesto a estafilococos; (ii) inhibir el desarrollo de la infección, esto es, detener o enlentecer su desarrollo; y/o (iii) aliviar los efectos de la infección, esto es, reducción de la carga bacteriana o erradicación completa de las bacterias en los sujetos infectados.

Mediante los procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica se puede determinar si una cantidad de anticuerpo contra la PNAG/dPNAG es una «cantidad eficaz para inducir la inmunidad contra la infección» gracias al uso de un ensayo de opsonización *in vitro* que es predictivo del grado de opsonización de un anticuerpo. Un anticuerpo que permite la opsonización las bacterias que expresan la PNAG, tales como las bacterias estafilocócicas que expresan la PNAG, es uno que cuando se añade a una muestra de tales bacterias provoca la fagocitosis de las bacterias. Un ensayo de opsonización puede ser un ensayo colorimétrico, un ensayo quimioluminiscente, un ensayo de captación de fluorescencia o de radiomarcador, un ensayo bactericida mediado por células u otro ensayo que mida el potencial de opsonización de un material.

Serán eficaces las dosis de anticuerpo que oscilan de 1 ng/kg a 100 mg/kg, según el modo de administración. El intervalo preferido se cree que está entre 500 ng y 500 µg/kg, y lo más preferiblemente entre 1 y 100 µg/kg. La cantidad absoluta dependerá de muchos factores, entre ellos si la administración se realiza en un sujeto de alto riesgo que todavía no está infectado con la bacteria o en un sujeto que ya tiene una infección, el tratamiento concurrente, el número de dosis y los parámetros de cada paciente, entre ellos la edad, estado físico, altura y peso.

Estos son factores bien conocidos por los expertos en la técnica y se pueden abordar simplemente con la experimentación convencional. Se prefiere por lo general que se utilice una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo con el juicio médico acertado.

5 También se contemplan las dosis múltiples de los anticuerpos de la invención. Por lo general, los esquemas de inmunización implican la administración de una dosis alta de un anticuerpo seguida de dosis más bajas posteriores tras un periodo de espera de varias semanas. También se pueden administrar más dosis. La posología de la dosis para la inmunización pasiva puede requerir la administración con más frecuencia. Simplemente con el empleo de la experimentación convencional, el experto en la técnica puede determinar los intervalos de tiempo deseados para la administración de varias dosis de un determinado anticuerpo contra la PNAG/dPNAG .

10 Existen muchas vías de administración. El modo concreto seleccionado dependerá, por supuesto, de la selección del anticuerpo concreto contra la PNAG/dPNAG, de la afección particular que se trata y de la dosis necesaria para la eficacia terapéutica. Los procedimientos de esta invención, hablando en términos generales, pueden ponerse en práctica con cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, lo que significa cualquier modo que produzca unos niveles eficaces de protección sin ocasionar efectos adversos clínicamente inaceptables. Los modos preferidos de administración son las vías parenterales. La terminología «parenteral» incluye la inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal e intraesternal, o las técnicas de infusión. Otras vías incluyen, pero sin limitarse a ellas, oral, nasal, dérmica, sublingual y local.

20 Los anticuerpos de la invención contra la PNAG/dPNAG pueden administrarse junto con otros fármacos antibacterianos (p. ej., antibióticos) o con otros anticuerpos antibacterianos. El uso de los antibióticos en el tratamiento de la infección bacteriana es un procedimiento habitual. Un vehículo de administración frecuente (p. ej., comprimido, implante, solución inyectable, etc.) puede contener tanto el anticuerpo de la invención como el fármaco y/o anticuerpo antibacteriano. Alternativamente, el fármaco y/o anticuerpo antibacteriano se puede dosificar por separado. El fármaco o anticuerpo antibacteriano también puede conjugarse al anticuerpo contra la PNAG/dPNAG.

30 Los fármacos antibacterianos se conocen bien e incluyen: penicilina G, penicilina V, ampicilina, amoxicilina, bacampicilina, ciclacilina, epicilina, hetacilina, pivampicilina, meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, carbenicilina, ticarcilina, aviocilina, mezlocilina, piperacilina, amdinocilina, cefalexina, cefradina, cefadroxil, cefaclor, cefazolina, cefuroxima, axetilo, cefamandol, cefonicid, cefoxitina, cefotaxima, ceftizoxima, cefmenoxina, ceftriaxona, moxalactam, cefotetan, cefoperazona, ceftazidima, imipenem, clavulanato, timentin, sulbactam, neomicina, eritromicina, metronidazol, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, vacomicina, trimetoprim-sulfametoxazol, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y rifampicina (véase Goodam y Gilman, *Pharmacological Basics of Therapeutics*, 8.^a ed, 1993, McGraw Hill Inc.).

35 De acuerdo con los procedimientos de la descripción, el péptido puede administrarse en una composición farmacéutica. En general, una composición farmacéutica comprende el péptido de la descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para péptidos, anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpo son bien conocidos por los expertos en la técnica. Tal y como se utiliza en la presente memoria, un vehículo farmacéuticamente aceptable significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos, p. ej., la capacidad del péptido para fijarse a la PNAG y/o la dPNAG estafilocócica y opcionalmente mejorar la opsonización y la fagocitosis.

40 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, sustancias de relleno, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales que se conocen bien en la técnica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables de ejemplo para los péptidos en particular se describen en la patente de los EE.UU. Nº 5.211.657. Tales preparaciones pueden contener convencionalmente sales, tamponantes, conservantes, vehículos compatibles y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cuando se utilizan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero se pueden utilizar ventajosamente sales que no son farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y no se descartan del alcance de la invención. Tales sales farmacológicas y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitarse a ellas, las preparadas a partir de los ácidos siguientes: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. También, se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables tales como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

50 Los péptidos de la descripción se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, apósitos, inhalantes e inyecciones, y las vías usuales para la administración son oral, parenteral o quirúrgica. La invención también abarca composiciones farmacéuticas que se formulan para la administración local, tal como mediante implantes.

55 Las composiciones adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas, tales como cápsulas, comprimidos, pastillas para chupar, y cada una contiene una cantidad predeterminada del agente activo. Otras composiciones incluyen suspensiones en líquidos acuosos o en líquidos no acuosos, tales como un jarabe, elixir o una emulsión.

Cuando los compuestos descritos en la presente memoria (incluidas las variedades peptídicas y no peptídicas) se utilizan terapéuticamente, en algunas realizaciones una vía de administración deseable puede ser el aerosol pulmonar. Las técnicas para preparar los sistemas de administración en aerosol que contienen los compuestos son bien conocidas por los expertos en la técnica. Por lo general, tales sistemas deben utilizar componentes que no alterarán significativamente las propiedades biológicas de los péptidos (véase, por ejemplo, Sciarra y Cutie, «Aerosols» en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, 1990, páginas 1694-1712, incorporado por referencia). Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los diferentes parámetros y condiciones para producir aerosoles sin recurrir a experimentación innecesaria.

Los procedimientos de la descripción también abarcan la etapa de administrar los péptidos de la invención junto con los tratamientos convencionales para tratar la infección bacteriana subyacente. Por ejemplo, el procedimiento de la descripción se puede practicar simultáneamente con un tratamiento convencional, tal como por ejemplo el tratamiento antibiótico. En algunas realizaciones, los péptidos de la invención se pueden administrar de forma sustancialmente simultánea con el tratamiento convencional. Con de forma sustancialmente simultánea se hace referencia a que un péptido de la descripción se administra a un sujeto lo suficientemente cerca en el tiempo de la administración del tratamiento convencional (p. ej., antibiótico), gracias a lo cual los dos compuestos pueden ejercer un efecto aditivo o incluso sinérgico. En algunos casos, el péptido y el agente del tratamiento convencional están conjugados entre sí. En otros, los compuestos mantienen una separación física.

Los péptidos de la descripción se pueden administrar directamente a un tejido. Preferiblemente, el tejido es uno en el cual existe la infección bacteriana. Alternativamente, el tejido es uno en el cual es probable que surja la infección. La administración directa al tejido se puede conseguir mediante la inyección directa. Los péptidos se pueden administrar una vez, o alternativamente se pueden administrar en varias administraciones. Si se administran varias veces, los péptidos se pueden administrar por vías diferentes. Por ejemplo, las primeras (o unas pocas de las primeras) administraciones se pueden realizar directamente en el tejido afectado, mientras que las administraciones posteriores pueden ser sistémicas.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones estériles acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones acuosas/alcohólicas, emulsiones o suspensiones, entre ellas disolución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, lactada de sodio, lactada de Ringer o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de líquidos y de nutrientes, reabastecedores de electrolitos (tal como los basados en la dextrosa de Ringer) y similares. Los conservantes y otros aditivos también pueden estar presentes, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y gases inertes y similares. Las dosis más bajas serán resultado de otras formas de administración, tales como la administración intravenosa. En el caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente en las dosis iniciales aplicadas, las dosis más altas (o las dosis eficazmente más altas mediante una vía de administración más localizada y diferente) se pueden aplicar hasta que la tolerancia del paciente lo permita. Se contemplan varias dosis al día para conseguir una concentración sistémica apropiada de los compuestos.

Aún en otras realizaciones, el vehículo preferido es una micropartícula o implante biocompatible que es adecuada para la implantación en el mamífero receptor. Los implantes bioerosionables de ejemplo que son útiles de acuerdo con este procedimiento se describen en la solicitud de patente internacional PCT N° PCT/US/03307 (publicación de patente internacional N° WO 95/24929 titulada «Polymeric Gene Delivery System», que reivindica la prioridad de la solicitud de patente de los EE.UU. con N° de serie 213.668, registrada el 15 de marzo de 1994). La PCT/US/0307 describe una matriz polimérica biocompatible, preferiblemente biodegradable, para contener una macromolécula biológica. La matriz polimérica puede utilizarse para conseguir una liberación prolongada del agente en un sujeto. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el agente descrito en la presente memoria se puede encapsular o dispersar dentro de la matriz polimérica biocompatible, preferiblemente biodegradable, descrita en la PCT/US/03307. La matriz polimérica preferiblemente está en forma de una micropartícula tal como una microesfera (en donde el agente se dispersa a través de una matriz polimérica sólida) o una microcápsula (en donde el agente se conserva en el núcleo de una cubierta capsular polimérica). Otras formas de la matriz polimérica para que contenga el agente incluyen películas, revestimientos, geles, implantes y derivaciones. El tamaño y la composición del dispositivo de la matriz polimérica se seleccionan para dar lugar a una cinética de liberación favorable en el tejido en el cual se implanta el dispositivo de la matriz. El tamaño del dispositivo de la matriz polimérica se selecciona además de acuerdo con el método de administración que se va a usar, típicamente inyección en un tejido o administración de una suspensión por aerosol en las áreas nasales y/o pulmonares. La composición de la matriz polimérica se puede seleccionar para que tenga una velocidad de degradación favorable y también para que esté formada por un material que es bioadhesivo, para que se incremente adicionalmente la eficacia de transferencia cuando el dispositivo se administra a una superficie vascular, pulmonar u otra superficie. La composición de la matriz también puede seleccionarse para que no se degrade, sino más bien para que se libere mediante difusión durante un intervalo de tiempo prolongado.

Tanto las matrices poliméricas biodegradables como las no biodegradables pueden utilizarse para administrar los agentes de la invención al sujeto. Se prefieren las matrices biodegradables. Tales polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. Se prefieren los polímeros sintéticos. El polímero se selecciona basándose en el tiempo que

se desea que dure la liberación, generalmente en el orden de unas pocas horas a un año o más. Típicamente, la liberación a lo largo de un intervalo que oscila entre unas pocas horas y tres a doce meses es lo más deseable. El polímero está opcionalmente en forma de un hidrogel que puede absorber hasta el 90% de su peso en agua y que además, opcionalmente, está entrecruzado con iones multivalentes u otros polímeros.

- 5 En general, los agentes de la invención se pueden administrar mediante el implante bioerosionable por medio de la difusión, o más preferiblemente, mediante la degradación de la matriz polimérica. Polímeros sintéticos de ejemplo que pueden utilizarse para formar el sistema de administración biodegradable incluyen: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, alcoholes de polivinilo, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, polivinilpirrolidona, poliglucólidos, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, alquicelulosa, hidroalquicelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutylmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, butirato de acetato de celulosa, ftalato de acetato de celulosa, carboxietilcelulosa, triacetato de celulosa, sal sódica de sulfato de celulosa, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(alcoholes vinílicos), acetato de polivinilo, cloruro de polivinilo, poliestireno y polivinilpirrolidona.

- Ejemplos de polímeros no biodegradables incluyen acetato de etilenvinilo, ácido poli(met)acrílico, poliamidas, copolímeros y mezclas de los mismos.

- Ejemplos de polímeros biodegradables incluyen polímeros sintéticos tales como polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido bórico), poli(ácido valérico) y poli(lactida-cocaprolactona) y polímeros naturales tales como alginato y otros polisacáridos entre ellos dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileno, hidroxilaciones, oxidaciones y otras modificaciones que los expertos en la técnica realizan de forma convencional), albúmina y otras proteínas hidrófilas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrófobas, copolímeros y mezclas de los mismos. En general, estos materiales se degradan bien mediante hidrólisis enzimática o bien por la exposición al agua *in vivo*, mediante desgaste superficial o general.

- Los polímeros bioadhesivos de interés particular incluyen hidrogeles bioerosionables descritos por H. S. Sawhney, C. P. Pathak y J. A. Hubell en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, cuyas enseñanzas se incorporan en la presente memoria, ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosán, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo) y poli(acrilato de octadecilo).

- Otros sistemas de administración pueden incluir sistemas de administración de liberación en el tiempo, liberación retrasada o liberación prolongada. Tales sistemas pueden impedir la repetición de la administración del péptido, lo que resulta mucho más cómodo para el sujeto y para el médico. Se dispone de muchos tipos de sistemas de administración de liberación retardada y los conocen los expertos en la técnica. Incluyen sistemas a base de polímeros tales como poli(lactida-glucólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen en, por ejemplo, la patente de los EE.UU. Nº 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos que incluyen esteroides tales como el colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono-, di- y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas de Silastic®; sistemas a base de péptidos; revestimientos de ceras; comprimidos que se comprimen con aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitarse a ellos: (a) sistemas de erosión en los cuales el reductor de plaquetas está contenido dentro de una matriz en una forma tal como las descritas en las patentes de los EE.UU. Nº 4.452.775, 4.675.189 y 5.736.152 y (b) sistemas de difusión en los cuales un componente activo lo atraviesa a una velocidad controlada desde un polímero tal como se describe en las patentes de los EE.UU. Nº 3.854.480, 5.133.975 y 5.407.686. Además, se pueden utilizar sistemas de administración mecánica mediante bombas, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

- El uso de un implante de liberación prolongada a largo plazo puede ser particularmente adecuado para el tratamiento profiláctico de los sujetos que corren el riesgo de sufrir una infección tal como una infección por estafilococos. La liberación a largo plazo, tal como la que se usa en la presente memoria, significa que el implante se construye y diseña para liberar concentraciones terapéuticas del ingrediente activo durante al menos 30 días y preferiblemente 60 días. Los implantes de liberación prolongada a largo plazo los conocen bien los expertos en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

- Los siguientes ejemplos se dan a conocer para ilustrar ejemplos específicos de la práctica de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención. Como será evidente para el experto en la técnica, la presente invención encontrará aplicación en multitud de composiciones y procedimientos.

Ejemplos

- S. aureus* y *S. epidermidis* están asociados a un abanico amplio de infecciones adquiridas en el hospital y extrahospitalarias. El aumento de la resistencia a los antibióticos impulsa el desarrollo de nuevos tratamientos para tratar y prevenir estas infecciones. La adhesión de las bacterias a los tejidos del hospedador o a dispositivos protésicos implantados es a menudo importante para que progrese la infección por estafilococos. Tal molécula de adhesión que se expresa en la superficie de los estafilococos *in vivo* y que se ha hallado que es una diana de los anticuerpos protectores es la poli-*N*-acetil-glucosamina (PNAG). Esta molécula de adhesión la expresan y utilizan otras bacterias tal como, pero sin limitarse a ella, *E. coli*.

Procedimientos experimentales

10 Hibridomas:

- Se recogió sangre de pacientes tras el comienzo de la infección de *S. aureus* y se aislaron células mononucleadas de la sangre periférica (PBMC) de las muestras sanguíneas mediante la sedimentación en Ficoll Hypaque. Se estimularon los linfocitos B mediante la exposición durante una noche al virus de Epstein-Barr (EBV) producido por la línea celular B95.8 como se describe en Posner et al (Posner et al., «Epstein Barr virus transformation of peripheral blood B cells secreting antibodies reactive with cell surface antigens». *Autoimmunity*. 1990; 8(2): 149-58).
- 15 Transcurridas 24 horas, se lavaron las células y se dispersaron en placas de 96 pocillos a una concentración de 1×10^6 PBMC/pocillo en 100 μ l del medio de crecimiento (RPMI1640 complementado con el STF al 20%) que contiene el medio acondicionado de linfocitos (LyCM [por su nombre en inglés], preparado de PBMC humanas estimuladas durante 48 horas con fitohemaglutinina) al 10%. Al cabo de 5 días se añadieron 100 μ l más del medio de crecimiento
- 20 complementado con LyCM al 10%. A continuación, las células estimuladas con el EBV se alimentaron semanalmente retirándoles 100 μ l del medio gastado y añadiéndoles 100 μ l del medio de crecimiento complementado con LyCM al 10%.

- Cuando los pocillos se sedimentaron densamente (como se puso de manifiesto por el crecimiento en más del 80% de la superficie del fondo de los pocillos y la aparición de un cambio de pH en el medio indicativo del crecimiento celular), los cultivos se escrutaron por ELISA para detectar la producción del anticuerpo específico contra la PNAG/dPNAG. A continuación, las células de cada pocillo que dio una reacción positiva al anticuerpo se dispersaron en 48 pocillos de una placa de cultivo de tejidos y, tras varios días de crecimiento, se analizó la reactividad de los sobrenadantes con el antígeno de la PNAG/dPNAG.
- 25

- A continuación, los cultivos que seguían dando positivo por ELISA se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón-humano HMMA 2.5 para generar hibridomas, tal y como ya está descrito (Posner et al. «The construction and use of a human-mouse myeloma analogue suitable for the routine production of hybridomas secreting human monoclonal antibodies». *Hybridoma*, de diciembre de 1987; 6(6): 611-25). Tras la fusión, las células se cultivaron en placas de micropocillos con el medio de crecimiento (RPMI 1640 complementado con STF al 20% e hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) y oubaina) para la selección de las células fusionadas. Estos cultivos se alimentaron a
- 30 intervalos semanales y se escrutó la producción de anticuerpos por ELISA.
- 35

- Se clonaron los hibridomas a una densidad de 1 célula/pocillo, los pocillos con un crecimiento positivo se escrutaron por ELISA en busca del anticuerpo específico, y los pocillos que contenían hibridomas que producían anticuerpos positivos se expandieron en los pocillos de las placas de cultivo de tejidos de un volumen creciente, luego en frascos de volumen creciente, para obtener las líneas de células clonadas. Se recuperaron tres hibridomas, denominados
- 40 F598, F628 y F630, que producían anticuerpos humanos de tipo IgG2 que se fijaban a la PNAG, a la dPNAG o a ambas.

Modificación química de la PNAG:

- Para retirar la mayoría de los sustituyentes en N y en O, la PNAG purificada se disolvió en NaOH a 5 M a una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubó durante 18 horas a 37 °C con agitación. A continuación, la solución en base fuerte se neutralizó con HCl a 5 N, a un pH final entre 6 y 8, y se dializó contra dH₂O durante 24 horas. El producto final se obtuvo mediante la liofilización de la muestra.
- 45

ELISA:

- Las placas de microtitulación Immulon 4 se revistieron con 100 μ l de la concentración de fijación óptima para cada antígeno (0,6 μ g/ml para la PNAG nativa y 3 μ g/ml para la dPNAG) en el tampón sensibilizador (NaH₂PO₄ a 0,2 M, Na₂HPO₄ a 0,2 M, azida al 0,02%) y se incubaron durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron 3x con PBS/Tween al 0,05% y se bloquearon con 200 μ l de leche desnatada al 5% en PBS y, a continuación, se incubaron durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron y los Acm purificados se añadieron a diferentes concentraciones diluidas en leche desnatada al 5%/Tween al 0,05% en PBS (tampón de dilución). Después, las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C y se lavaron. Se añadieron 100 μ l del anticuerpo secundario (molécula completa de IgG
- 50 antihumana conjugada a la fosfatasa alcalina (AP, por su nombre en inglés) y comprada a ICN) a una dilución 1:1000 hecha en el tampón de dilución. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 h y se lavaron. Se añadieron 100 μ l de fosfato de p-nitrofenilo a una concentración de 1 mg/ml en el tampón del sustrato (800 mg de NaHCO₃, 1,46 g
- 55

de Na₂CO₃, 10 mg de MgCl, 20 mg de Na₃N en 500 ml de H₂O) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Las placas se leyeron a 405 nm. Se utilizó la IgG humana purificada de Sigma como estándar para cuantificar los Acm en las placas sensibilizadas con la IgG antihumana.

Ensayo de deposición del complemento:

- 5 Las placas de microtitulación se prepararon como para el ensayo ELISA. Tras la incubación con el Acm y el lavado, el suero humano normal absorbido con tres diferentes cepas de *S. aureus* se utilizó como fuente del complemento a una dilución de 1:50 en el tampón de dilución. Las placas se incubaron durante 15 min a 37 °C. Tras el lavado de la placa, se añadió el anticuerpo anti-C3 humano de cabra a una concentración de 1:2000 y se incubó durante una hora a 37 °C. Se añadió un conjugado de IgG-AP anticabra a 1:2000 y se incubó a 37 °C durante una hora. Las placas se desarrollaron esencialmente como para el ensayo ELISA, excepto que sólo duró 15 min.
- 10

Ensayos de opsonofagocitosis:

- Los ensayos de muerte por opsonofagocitosis se habían descrito con anterioridad (véase Ames et al., *Infection and Immunity* 49: 281-285, 1985 y Maira-Litran et al., *Infect Immun.* 70(8): 4433-4440, 2002). La cepa diana utilizada es Mn8 (*S. aureus*). La cepa diana se hizo crecer hasta una densidad óptica de 0,4 a una longitud de onda de 650 nm (DO₆₅₀) y se diluyó a 1:100 para el ensayo. El complemento (obtenido de un conejo lactante a partir de una fuente comercial tal como Accurate Chemical And Scientific Corp. Westbury, Nueva York 11590, y utilizado a una dilución de 1:15) se absorbió durante 1 h con la cepa Mn8m de *S. aureus* (resuspendida a una DO₆₅₀ de 1,0).
- 15

- Los linfocitos polimorfonucleados (PMN) se separaron de la sangre humana recién extraída con heparina/dextrano (mezcla 1:1). Los PMN se utilizaron a una concentración de 5 x 10⁶ células/ml. Las soluciones con los anticuerpos monoclonales a distintas concentraciones se utilizaron como fuente de anticuerpo. Se añadieron juntos 100 µl de cada componente (la solución de anticuerpo monoclonal, los PMN, el complemento, las bacterias diana) y luego se incubaron durante 1,5 h a 37 °C, mientras estaban en rotación. Se tomaron los sobrenadantes y se realizaron las diluciones y las alícuotas se sembraron entonces sobre agar de soja trípica (TSA), que se suele utilizar a diluciones de 1:100 y 1:1000. Tras incubar durante una noche a 37 °C, se contaron las colonias bacterianas y se calculó la tasa de muerte.
- 20
- 25

Clonación de las regiones variables de los anticuerpos:

- La extracción del ARN de cada hibridoma se realizó a aproximadamente 6 x 10⁶ células con el kit RNeasy de Qiagen. Se retrotranscribió 1 µg de ARN total en ADNc con el kit Omniscript de Qiagen. Se utilizó 1 µl del producto del ADNc como plantilla para las reacciones de PCR. Cada reacción constaba de 50 µl de la mezcla Hi fi de Invitrogen, 100 pmol de cada cebador nucleotídico y 1 µl de la plantilla de ADNc. Se realizaron aproximadamente 30 ciclos de PCR con el protocolo siguiente: 94 °C durante 30 s, ciclo: 94 °C durante 30 s, 65 °C durante 30 s, 72 °C durante 1 min, extensión final a 72 °C durante 5 min. Se secuenciaron los productos de PCR y se realizaron búsquedas con el programa Ig BLAST contra las secuencias de líneas reproductoras conocidas que estaban disponibles en la base de datos del NCBI.
- 30
- 35 Los cebadores utilizados para clonar las regiones variables del anticuerpo de las líneas celulares de hibridoma depositadas con los N° de acceso PTA-5931, PTA-5932 y PTA-5933 en la ATCC el 21 de abril de 2004 son los siguientes: (5'-3' con los sitios de restricción subrayados y los ATG iniciadores en negrita):

Cadena ligera de F598

Constante λ: **GACCGAGGGGGCAGCCTTGGGCTGACCTAGG** (SEQ ID NO: 49)

- 40 Hu λ sig 5: AGATCTCTCACCATGGCATGGATCCCTCTCTTC (SEQ ID NO: 50)

Cadena pesada de F598

Constante de la cadena pesada: TGGGCCCTTGGTGCTAGCTGAGGAGAC (SEQ ID NO: 51)

VH7LDRHU: GTCGACATGAAACATCTGTGGTTCTTC (SEQ ID NO: 52)

Cadena ligera de F628

- 45 Constante λ: **GACCGAGGGGGCAGCCTTGGGCTGACCTAGG** (SEQ ID NO: 49)

Hu λ sig 1: AGATCTCTCACCATGGCCRGCTTCCCTCTCTTC (SEQ ID NO: 53)

Cadena pesada de F628

Constante de la cadena pesada: TGGGCCCTTGGTGCTAGCTGAGGAGAC (SEQ ID NO: 51)

VH7LDRHU: GTCGACATGAAACATCTGTGGTTCTTC insertar secuencia (SEQ ID NO: 52)

Cadena ligera de F630

Constante λ: GACCGAGGGGGCAGCCTTGGGCTGACCTAGG (SEQ ID NO: 49)

Hu λ sig 5: AGATCTCTCACCATGGCATGGATCCCTCTCTTC (SEQ ID NO: 50)

5 Cadena pesada de F630

Constante de la cadena pesada: TGGGCCCTTGGTCTAGCTGAGGAGAC (SEQ ID NO: 51)

VH1LDRHU: GTCGACATGGACTGGACCTGGA (SEQ ID NO: 54)

Ensayos de provocación bacteriana *in vivo*:

10 A los ratones se les administró por vía intravenosa (i.v.) el Acm F598 que se fija a la PNAG y la dPNAG, o un control que no se fija a PNAG/dPNAG, el Acm humano de tipo IgG1 contra el alginato o la MEP de *P. aeruginosa* (denominado Acm F429) para inducir la inmunidad pasiva. Al cabo de 24 horas, los ratones se expusieron a *S. aureus* (5×10^7 UFC/ratón) por la misma vía de administración que el Acm.

La cantidad de UFC en la sangre 2 horas después de la infección se utilizó como medida de la eficacia que tiene el Acm administrado para inducir la inmunidad pasiva contra *S. aureus*.

15 Resultados

Secuencia de los Acm:

A continuación se muestran las secuencias nucleotídicas y aminoácidas para las regiones variables y para las CDR de los Acm F598, F628 y F630. Las regiones CDR están subrayadas y las regiones constantes en cursiva.

1a. Alineamiento de las secuencias aminoácida y nucleotídica de la región variable de la cadena pesada de F598

20

CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	GAG	TCG	GGC	CCA	GGA	CTG	GTG	AAG	CCT	TCG
Q	V	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S
GAG	ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	ACT	GTT	TCT	GGT	GGC	TCC	ATC	AGT
E	T	L	S	L	T	C	T	V	S	G	G	S	I	S
GGT	TAC	TAC	TGG	AGT	TGG	ATC	CGG	CAG	CCC	CCA	GGG	AAG	GGA	CTG
G	Y	Y	W	S	W	I	R	Q	P	P	G	K	G	L
GAG	TGG	ATT	GGG	TAT	ATT	CAT	TAT	AGT	AGG	AGC	ACC	AAC	TCC	AAC
E	W	I	G	Y	I	H	Y	S	R	S	T	N	S	N
CCC	GCC	CTC	AAG	AGT	CGA	GTC	ACC	ATA	TCA	TCA	GAC	ACG	TCC	AAG
P	A	L	K	S	R	V	T	I	S	S	D	T	S	K
AAC	CAG	CTC	TCC	CTG	AGA	CTG	AGC	TCA	GTG	ACC	GCT	GCG	GAC	ACG
N	Q	L	S	L	R	L	S	S	V	T	A	A	D	T
GCC	GTG	TAT	TAC	TGT	GCG	AGA	GAT	ACC	TAT	TAC	TAT	GAT	AGT	GGT
A	V	Y	Y	C	A	R	D	T	Y	Y	Y	D	S	G
GAT	TAT	GAG	GAT	GCT	TTT	GAT	ATT	TGG	GGC	CAA	GGG	ACA	ATG	GTC
D	Y	E	D	A	F	D	I	W	G	Q	G	T	M	V
ACC	GTC	TCC	TCA											
T	V	S	S											

(SEQ ID NO: 25)
(SEQ ID NO: 1)

1b. Secuencia aminoácida de la región variable de la cadena pesada de F598

ES 2 738 112 T3

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISGYIYWSWIRQPPGKGLEWIGYIHYSRSTNSNPA
LKSRVTISSDTSKNQLSLRLSSVTAADTAVYYCARDTYYIYDSGDYEDAFDIWGQGTMTVTVSS
(SEQ ID NO: 1)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISGYIYWSWIRQPPGKGLEWIGYIHYSRSTNSNPA
LKSRVTISSDTSKNQLSLRLSSVTAADTAVYYCARDTYYIYDSGDYEDAFDIWGQGTMTVTVSS
AS (SEQ ID NO: 55)

lc. Secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada de F598

CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG
GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTT TCT GGT GGC TCC ATC AGT
GGT TAC TAC TGG AGT TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG
GAG TGG ATT GGG TAT ATT CAT TAT AGT AGG AGC ACC AAC TCC AAC
CCC GCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA TCA GAC ACG TCC AAG
AAC CAG CTC TCC CTG AGA CTG AGC TCA GTG ACC GCT GCG GAC ACG
GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT ACC TAT TAC TAT GAT AGT GGT
GAT TAT GAG GAT GCT TTT GAT ATT TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC
ACC GTC TCC TCA

(SEQ ID NO: 25)

CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG
GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTT TCT GGT GGC TCC ATC AGT
GGT TAC TAC TGG AGT TGG ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG
GAG TGG ATT GGG TAT ATT CAT TAT AGT AGG AGC ACC AAC TCC AAC
CCC GCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA TCA GAC ACG TCC AAG
AAC CAG CTC TCC CTG AGA CTG AGC TCA GTG ACC GCT GCG GAC ACG
GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT ACC TAT TAC TAT GAT AGT GGT
GAT TAT GAG GAT GCT TTT GAT ATT TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC
ACC GTC TCC TCA GCT AGC

(SEQ ID NO: 56)

ES 2 738 112 T3

Ila. Alineamiento de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de la región variable de la cadena ligera de F598

CAG CTT GTG CTG ACT CAG TCG CCC TCT GCC TCT GCC TCC CTG GGA
Q L V L T Q S P S A S A S L G
 GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACT CTG AGC AGT GGC CAC AGC AAC
A S V K L T C T L S S G H S N
 TAC GCC ATC GCT TGG CAT CAG CAG CAG CCA GGG AAG GGC CCT CGC
Y A I A W H Q Q Q P G K G P R
 TAC TTG ATG AAG GTT AAC AGA GAT GGC AGC CAC ATC AGG GGG GAC
Y L M K V N R D G S H I R G D
 GGG ATC CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC ACC TCT GGG GCT GAG CGT
G I P D R F S G S T S G A E R
 TAC CTC ACC ATC TCC AGT CTC CAG TCT GAA GAT GAG GCT GAC TAT
Y L T I S S L Q S E D E A D Y
 TAC TGT CAG ACC TGG GGC GCT GGC ATT CGA GTG TTC GGC GGA GGG
Y C Q T W G A G I R V F G G G
 ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT (SEQ ID NO: 26)
T K L T V L G (SEQ ID NO: 2)

Ilb. Secuencia aminoacídica de la región variable de la cadena ligera de F598

QLVLTSQSPSASASLGASVKLTCT**TLSSGHSNYAIAIA**WHQQQPGKGPRYLMK**VNRDGS**HIRGDGI
 PDRFSGSTSGAERYLTISLQSEDEA DYYC**QTWGAGIRV**FGGGTKLTVLG
 (SEQ ID NO: 2)
 QLVLTSQSPSASASLGASVKLTCT**TLSSGHSNYAIAIA**WHQQQPGKGPRYLMK**VNRDGS**HIRGDGI
 PDRFSGSTSGAERYLTISLQSEDEA DYYC**QTWGAGIRV**FGGGTKLTVLGPKAAPSV
 (SEQ ID NO: 57)

Ilc. Secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena ligera de F598

CAG CTT GTG CTG ACT CAG TCG CCC TCT GCC TCT GCC TCC CTG GGA
 GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACT CTG AGC AGT GGC CAC AGC AAC
 TAC GCC ATC GCT TGG CAT CAG CAG CAG CCA GGG AAG GGC CCT CGC
 TAC TTG ATG AAG GTT AAC AGA GAT GGC AGC CAC ATC AGG GGG GAC
 GGG ATC CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC ACC TCT GGG GCT GAG CGT
 TAC CTC ACC ATC TCC AGT CTC CAG TCT GAA GAT GAG GCT GAC TAT
 TAC TGT CAG ACC TGG GGC GCT GGC ATT CGA GTG TTC GGC GGA GGG
 ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT
 (SEQ ID NO: 26)

ES 2 738 112 T3

IIIa. Alineamiento de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de la región variable de la cadena pesada de F628

CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG
Q V Q L Q E S G P G L V K P S
 GAG ACC CTG TCC CTC ACG TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGT
E T L S L T C T V S G G S I S
 AAT TAC TAC TGG AGT TGG ATC CGG CAG TCC CCA GGG AGG GGA CTG
N Y Y W S W I R Q S P G R G L
 GAG TGG ATT GGG TAT ATC CAT TAT AGT GGG AGC ACC AAC TCC AAT
E W I G Y I H Y S G S T N S N
 CCA TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTT GAC ACG TCC AAG
P S L K S R V T I S V D T S K
 AAC CAG GTC TCC CTG AAG CTG GGC TCT GTG ACC GCT GCG GAC ACG
N Q V S L K L G S V T A A D T
 GCC ATA TAT TAC TGT GCG AGA GAT ACT TAC TAT GAA AGT AGT GGT
A I Y Y C A R D T Y Y E S S G
 CAT TGG TTC GAC GGT TTG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC TCG GTC
H W F D G L D V W G Q G T S V

IIIb. Secuencia aminoacídica de la región variable de la cadena pesada de F628

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS**NYIYWS**WIRQSPGRGLEWIG**YIHYSGSTNSNPS**
LKSRVTISVDTSKNQVSLKLGSVTAADTAIYYCARDTYIYESSGHWF**DGLDV**WGQGTSVTVSS
 (SEQ ID NO: 3)
 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS**NYIYWS**WIRQSPGRGLEWIG**YIHYSGSTNSNPS**
LKSRVTISVDTSKNQVSLKLGSVTAADTAIYYCARDTYIYESSGHWF**DGLDV**WGQGTSVTVSS
 ASTKGP (SEQ ID NO: 58)

IIIc. Secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada de F628

CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG
 GAG ACC CTG TCC CTC ACG TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGT
 AAT TAC TAC TGG AGT TGG ATC CGG CAG TCC CCA GGG AGG GGA CTG
 GAG TGG ATT GGG TAT ATC CAT TAT AGT GGG AGC ACC AAC TCC AAT
 CCA TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTT GAC ACG TCC AAG
 AAC CAG GTC TCC CTG AAG CTG GGC TCT GTG ACC GCT GCG GAC ACG
 GCC ATA TAT TAC TGT GCG AGA GAT ACT TAC TAT GAA AGT AGT GGT
 CAT TGG TTC GAC GGT TTG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC TCG GTC
 ACC GTC TCC TCA
 (SEQ ID NO: 27)
 CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG
 GAG ACC CTG TCC CTC ACG TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC ATC AGT
 AAT TAC TAC TGG AGT TGG ATC CGG CAG TCC CCA GGG AGG GGA CTG
 GAG TGG ATT GGG TAT ATC CAT TAT AGT GGG AGC ACC AAC TCC AAT

ES 2 738 112 T3

CCA TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTT GAC ACG TCC AAG
 AAC CAG GTC TCC CTG AAG CTG GGC TCT GTG ACC GCT GCG GAC ACG
 GCC ATA TAT TAC TGT GCG AGA GAT ACT TAC TAT GAA AGT AGT GGT
 CAT TGG TTC GAC GGT TTG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC TCG GTC
 ACC GTC TCC TCA GCT AGC ACC
 (SEQ ID NO: 59)

IVa. Alineamiento de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de la región variable de la cadena ligera de F628

CAG CCT GTG CTG ACT CAG TCG CCC TCT GCC TCT GCC TCC CTG GGA
Q P V L T Q S P S A S A S L G
 GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACT CTG GAC AGT GAA CAC AGC AGA
A S V K L T C T L D S E H S R
 TAC ACC ATC GCA TGG CAT CAG CAG CAG CCA GAG AAG GGC CCT CGG
Y T I A W H Q Q Q P E K G P R
 TAC CTG ATG AAG GTT AAG AGT GAT GGC AGT CAC AGC AAG GGG GAC
Y L M K V K S D G S H S K G D
 GGC ATT ACT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT GGG GCT GAG CGC
G I T D R F S G S S S G A E R
 TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT GAG GCT GAC TAT
Y L T I S S L Q S E D E A D Y
 TAC TGT CAG ACT TGG GGC CCT GGC ATT CGA GTG TTC GGC GGA GGG
Y C Q T W G P G I R V F G G G
 ACC AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 28)
T K L T V L (SEQ ID NO: 4)

IVb. Secuencia aminoacídica de la región variable de cadena ligera de F628

QPVL**TQSPSASASL**GASVKLT**CTLDSEHSRYTIA**WHQQQPEKGP**RYLMK****VKSDGSHSKG**DGI
 TDRFSGSSSSGAERYLT**ISSLQSEDEA** DYYC**QTWGP**GIRVFGGGTKLTVL
 (SEQ ID NO: 4)

IVc. Secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena ligera de F628

CAG CCT GTG CTG ACT CAG TCG CCC TCT GCC TCT GCC TCC CTG GGA
 GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACT CTG GAC AGT GAA CAC AGC AGA
 TAC ACC ATC GCA TGG CAT CAG CAG CAG CCA GAG AAG GGC CCT CGG
 TAC CTG ATG AAG GTT AAG AGT GAT GGC AGT CAC AGC AAG GGG GAC
 GGC ATT ACT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT GGG GCT GAG CGC
 TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT GAG GCT GAC TAT
 TAC TGT CAG ACT TGG GGC CCT GGC ATT CGA GTG TTC GGC GGA GGG
 ACC AAG CTG ACC GTC CTA (SEQ ID NO: 28)

ES 2 738 112 T3

Va. Alineamiento de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de la región variable de la cadena pesada de F630

```

CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG ATG AAG AGG CCT GGG
Q V Q L V Q S G A E M K R P G

GCC TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC ACC TTT ACC
A S V K V S C K A S G Y T F T

AAC TTT GGT ATC AGT TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT
N F G I S W V R Q A P G Q G L

GAG TGG ATA GGA TGG GTC AGC ACT TAC AAT GGT CGC ACA AAT TAT
E W I G W V S T Y N G R T N Y

GCA CAG AAG TTC CGG GGC AGA GTC ACC ATG ACC ACA GAC ACA TCC
A Q K F R G R V T M T T D T S

ACG AAC ACA GCG TAC ATG GAA CTG AGG AGC CTG GGA TCT GAC GAC
T N T A Y M E L R S L G S D D

ACG GCC GTC TTT TAC TGT GCG AGA GAT TAC TAT GAG ACT AGT GGT
T A V F Y C A R D Y Y E T S G

TAC GCC TAT GAT GAT TTT GCG ATC TGG GGC CAA GGG ACA TTG GTC
Y A Y D D F A I W G Q G T L V

ACC GTC TCC TCA (SEQ ID NO: 29)
T V S S (SEQ ID NO: 5)

```

Vb. Secuencia aminoacídica de la región variable de la cadena pesada de F630

```

QVQLVQSGAEMKRPASVKVSKASGYFTNFGISWVRQAPGQGLEWIGWVSTYNGRTNYAQ
KFRGRVTMTTDTSTNTAYMELRSLGSDDTAVFYCARDYETSGYAYDDFAIWGQGLVTVSS
(SEQ ID NO: 5)

```

Vc. Secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena pesada de F630

```

CAG GTT CAG CTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG ATG AAG AGG CCT GGG
GCC TCA GTG AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGT TAC ACC TTT ACC
AAC TTT GGT ATC AGT TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT
GAG TGG ATA GGA TGG GTC AGC ACT TAC AAT GGT CGC ACA AAT TAT
GCA CAG AAG TTC CGG GGC AGA GTC ACC ATG ACC ACA GAC ACA TCC
ACG AAC ACA GCG TAC ATG GAA CTG AGG AGC CTG GGA TCT GAC GAC
ACG GCC GTC TTT TAC TGT GCG AGA GAT TAC TAT GAG ACT AGT GGT
TAC GCC TAT GAT GAT TTT GCG ATC TGG GGC CAA GGG ACA TTG GTC
ACC GTC TCC TCA

```

ES 2 738 112 T3

Vla. Alineamiento de las secuencias nucleotídica y aminoacídica de la región variable de la cadena ligera de F630

```

CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT GCT TCC CTG GGA
Q   L   V   L   T   Q   S   P   S   A   S   A   S   L   G

GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACT CTG AGC AGT GGG CAC AGC ACC
A   S   V   K   L   T   C   T   L   S   S   G   H   S   T

TAC GCC ATC GCG TGG CAT CAG CAG CAG CCA CTG AGG GGT CCT CGT
Y   A   I   A   W   H   Q   Q   Q   P   L   R   G   P   R

TTC TTG ATG AAA GTC AAC AGT GAT GGC AGC CAC ACC AAG GGG GAC
F   L   M   K   V   N   S   D   G   S   H   T   K   G   D

GGG ATC CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGT TCT GGG GCT GAG CGC
G   I   P   D   R   F   S   G   S   S   S   S   G   A   E   R

TAC CTC TCC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAA GAT GAG TCT GAC TAT
Y   L   S   I   S   S   L   Q   S   E   D   E   S   D   Y

TAC TGT CAG ACG TGG GGC CCT GGC ATT CGA GTG TTC GGC GGA GGG
Y   C   Q   T   W   G   P   G   I   R   V   F   G   G   G

ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT   (SEQ ID NO: 30)
T   K   L   T   V   L   G       (SEQ ID NO: 6)

```

Vlb. Secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena ligera de F630

```

QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTTLSSGHSTYAIAIAWHQQQPLRGPRFLMKVNSDGSHTKGDGI
PDRFSGSSSGAERYLSISSLQSEDESDYYCQTWGPGLIRVFGGGTKLTVLG
(SEQ ID NO: 6)

```

```

QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTTLSSGHSTYAIAIAWHQQQPLRGPRFLMKVNSDGSHTKGDGI
PDRFSGSSSGAERYLSISSLQSEDESDYYCQTWGPGLIRVFGGGTKLTVLGGPKAAPSV
(SEQ ID NO: 60)

```

Vlc. Secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena ligera de F630

CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT GCT TCC CTG GGA
 GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACT CTG AGC AGT GGG CAC AGC ACC
 TAC GCC ATC GCG TGG CAT CAG CAG CAG CCA CTG AGG GGT CCT CGT
 TTC TTG ATG AAA GTC AAC AGT GAT GGC AGC CAC ACC AAG GGG GAC
 GGG ATC CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGT TCT GGG GCT GAG CGC
 TAC CTC TCC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAA GAT GAG TCT GAC TAT
 TAC TGT CAG ACG TGG GGC CCT GGC ATT CGA GTG TTC GGC GGA GGG
 ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT (SEQ ID NO: 30)
 CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT GCT TCC CTG GGA
 GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACT CTG AGC AGT GGG CAC AGC ACC
 TAC GCC ATC GCG TGG CAT CAG CAG CAG CCA CTG AGG GGT CCT CGT
 TTC TTG ATG AAA GTC AAC AGT GAT GGC AGC CAC ACC AAG GGG GAC
 GGG ATC CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGT TCT GGG GCT GAG CGC
 TAC CTC TCC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAA GAT GAG TCT GAC TAT
 TAC TGT CAG ACG TGG GGC CCT GGC ATT CGA GTG TTC GGC GGA GGG
 ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT CAG CCC AAG GCT GCC CCA TCG GTC
 ACC TGT TCC CGC CTC (SEQ ID NO: 61)

Caracterización de los Acm de tipo IgG2:

- Los hibridomas se nombraron según su correspondiente número de fusión: F598, F628 y F630. Los anticuerpos
 5 producidos por estos hibridomas eran todos de los tipos de IgG2 y λ . Después de la purificación de los anticuerpos
 utilizando columnas de proteína G, se utilizaron los ELISA para determinar las diferencias en las especificidades de
 los epítomos de los Acm. Se realizó la modificación química de la PNAG nativa para retirar determinados
 sustituyentes. El tratamiento con base fuerte (NaOH a 5 M) da lugar a la eliminación de la mayoría de los grupos N-
 acetilo. Tal y como se observa en la figura 1, todos los Acm se fijan bien a la forma nativa de la PNAG, aunque con
 10 diferentes curvas de fijación. Cuando la PNAG se trata con NaOH a 5 M para producir la dPNAG, el Acm F598 se fija
 con la mayor actividad (figura 2). Este resultado sugiere que el F598 tiene especificidad por los epítomos del
 esqueleto de la PNAG y no requiere grupos N- ni O-acetilados para fijarse al polímero de la PNAG. Los Acm F630 y
 F628 se fijan mal a la dPNAG, lo que sugiere que su especificidad requiere que los acetatos se encuentren en la
 forma nativa de la PNAG.
- 15 Los ELISA de competición se utilizaron para determinar la actividad de fijación relativa de los Acm. La figura 3
 muestra que la actividad de fijación relativa de los Acm es: F598 > F628 > F630.

Creación y caracterización de los Acm cambiados a IgG1:

- Los anticuerpos del isotipo IgG1 humano son capaces de fijar el complemento sobre la superficie de un antígeno
 mejor que los anticuerpos del isotipo IgG2. Por consiguiente, se clonaron las regiones variables de los Acm y se
 20 produjo el isotipo IgG1. Los cebadores específicos de la región constante de IgG2 y los cebadores específicos para
 el extremo 5' de las regiones variables identificados en los hibridomas originales (véase la lista de cebadores del
 presente documento en «Clonación de las regiones variables de los anticuerpos») se utilizaron para obtener los
 productos de PCR de las preparaciones de ADNc hechas a partir del ARNm aislado de las líneas celulares originales
 del hibridoma de IgG2. Los productos de PCR se secuenciaron y analizaron para determinar los genes de las líneas
 25 reproductoras que con más probabilidad daban lugar a cada anticuerpo. Tal y como se muestra en la tabla 1, hay
 genes de las líneas reproductoras que se utilizan en todos los hibridomas para fabricar anticuerpos dirigidos contra la
 PNAG y/o la dPNAG. Como se muestra, los Acm F598, F628 y F630 utilizan los mismos genes de cadena ligera de
 las líneas reproductoras y las mismas regiones D de la cadena pesada. La única diferencia es el gen V utilizado para
 producir la cadena pesada del Acm F630 y el gen J utilizado para producir la cadena pesada del Acm F628; el resto
 30 de los genes de las líneas reproductoras son idénticos en todos los Acm.

Tabla 1

Cadena L o H del hibridoma	Genes de las líneas reproductoras		
F598L	IGLV4-69 o V5-6		IGLJ3 o IGLJ2
F598H	IGHV4-59	IGHD3-22	IGHJ3
F628L	IGLV4-69 o V5-6		IGLJ3 o IGLJ2
F628H	IGHV4-59	IGHD3-22	IGHJ6
F630L	IGLV4-69 o V5-6		IGLJ3 o IGLJ2
F630H	IGHV1-18	IGHD3-22	IGHJ3

El ADN que codifica toda la región variable que abarca los segmentos V, J y D para la cadena pesada y los segmentos V y J para la cadena ligera de cada uno de los Acm (F598, F628 y F630) se clonó en el vector TCAE6, que contiene la cadena ligera κ y las regiones constantes humanas de la cadena pesada de IgG1. Las construcciones iniciales mantuvieron el emparejamiento original de los genes de la cadena ligera y la cadena pesada obtenido de los hibridomas originales. El ADN plasmídico que contiene cada una de las construcciones se transfirió a las células CHO y se purificaron y caracterizaron los Acm de IgG1 resultantes. Como se observa en las figuras 4 y 5, todos los Acm de IgG1 tienen curvas de fijación a la PNAG idénticas cuando se comparan con los Acm de IgG2 originales; sin embargo, las construcciones de IgG1 de los Acm F628 y F630 han perdido parte de su capacidad para fijarse a la dPNAG (p. ej., compárese con las figuras 1 y 2).

Para comprobar si los Acm de IgG1 tienen una actividad más funcional de activación del complemento que los Acm parentales de IgG2, se realizaron los ensayos de deposición del complemento. El ensayo de deposición del complemento es esencialmente un ensayo ELISA que mide la deposición de la proteína C3 del complemento cuando se añade suero humano a la mezcla de reacción. Tal y como se muestra en la figura 6, todos los Acm de IgG1 tienen una actividad fijadora del complemento mejor que la de los Acm de IgG2 parentales. El grado de incremento de la fijación del complemento depende del Acm. En el caso del Acm F598, que tiene la actividad de fijación más alta a la PNAG y a la dPNAG, solo hay un ligero incremento de la actividad del isotipo IgG1 sobre el IgG2. En el caso de los Acm F628 y F630, los Acm del isotipo IgG1 tiene al menos el doble de actividad de deposición del complemento que los Acm parentales del isotipo IgG2.

Actividad de opsonofagocitosis:

Se analizó la actividad de opsonofagocitosis de los anticuerpos monoclonales F598, F628 y F630 tanto en la forma IgG1 como en la IgG2 (6 μg del Acm) contra la cepa Mn8 de *S. aureus*. El anticuerpo monoclonal F598 mostró el nivel más alto de reducción (a saber, muerte) en UFC cuando se utilizó la forma IgG1 (figura 7).

Protección pasiva contra la infección:

La administración del Acm F598 que se fija tanto a la PNAG como la dPNAG en los ratones 24 horas antes de la exposición a la cepa Mn8 de *S. aureus* dio lugar a una reducción del 68% del número de UFC/ml en la sangre a las 2 horas de la infección en comparación con los ratones que reciben un Acm contra un antígeno irrelevante, el alginato de *P. aeruginosa* (significancia de $P = 0,002$) (figura 8A). La figura 8B muestra las UFC de *S. aureus* por mililitro de sangre para cada animal por separado al que se le dio bien el Acm de control o bien el Acm F598g1. La administración de 800 μg del Acm F598 por ratón FVB 4 horas antes de la exposición intraperitoneal (i.p.) con 5×10^8 UFC de *S. aureus* (cepa Mn8) dio lugar a un incremento de la supervivencia en comparación con los ratones a los que se les administró un Acm de control (F429 específico contra *P. aeruginosa*). La figura 8C muestra los resultados de estos experimentos. A los 5 días de la exposición bacteriana, estaban vivos todos los ratones que recibieron el F598 y sólo aproximadamente el 20% de los ratones que recibieron el Acm de control (8 ratones por grupo).

Aislados de la infección de las vías urinarias por *E. coli*:

Se aislaron 18 aislados clínicos con infección de las vías urinarias (IVU) por *E. coli* y se les analizó la presencia del locus *pga* por PCR y la expresión de la PNAG por inmunotransferencia con antisuero generado contra la PNAG de *S. aureus*. Los aislados clínicos se hicieron crecer en cultivo y o bien se extrajo el ADN mediante técnicas estándares para el uso en la PCR o se sometieron las células a extracción en EDTA (hirviendo durante 5 minutos) una vez que las células estaban en la fase estacionaria. Se determinó por PCR que 17 de los 18 aislados llevaban los genes *pga*. Basándose en los resultados de la inmunotransferencia, de estos 17, aproximadamente un tercio se comprobó que expresaban una cantidad relativamente alta de PNAG, aproximadamente un tercio se comprobó que expresaba una cantidad relativamente intermedia (o moderada) de PNAG y el tercio restante se comprobó que expresaba una cantidad relativamente baja de PNAG. Además, la sobreexpresión del locus *pga* dio lugar a una

mejora de la producción de PNAG. La figura 9 muestra los resultados de esta inmunotransferencia. La cepa «H» expresa una cantidad indetectable de PNAG y no tiene un locus *pga*. La franja en la esquina superior derecha representa la cepa de *E. coli* que sobreexpresa *pga*.

La figura 10 muestra el nivel de la muerte por opsonización de los aislados clínicos con IVU por *E. coli* antes mencionados utilizando un antisuero policlonal generado contra la dPNAG de *S. aureus*. BW representa una cepa de *E. coli* de tipo silvestre, *pga* representa una cepa de *E. coli* sin el locus *pga*, y *pga*⁺⁺ representa una cepa de *E. coli* que sobreexpresa *pga*. El nivel de muerte se correlaciona más o menos con el nivel de expresión de PNAG en el aislado de *E. coli*.

Las figuras 11A y 11B muestran el nivel de muerte por opsonización de una cepa de *E. coli* que expresa una gran cantidad de PNAG (cepa U) y una cepa de *E. coli* que expresa una cantidad intermedia de PNAG (cepa P) mediante el antisuero policlonal generado contra la dPNAG y la PNAG. En todas las diluciones de antisuero ensayadas, el antisuero contra la dPNAG era más eficaz a la hora de matar las cepas que el antisuero contra la PNAG.

La figura 12 muestra la actividad de opsonofagocitosis del Acm F598 contra diferentes cepas estafilocócicas y una cepa de *E. coli* mediante los Acm F598, F628 y F630 (6 µg/ml de Acm por ensayo).

15 Mutación del locus *ica*:

Las figuras 13 y 14 muestran los resultados de muerte por los Acm F598 y F628 de las cepas de *S. aureus* que tienen el locus *ica* mutante. A la cepa 10833 de *S. aureus* se le eliminó el locus *ica* (10833Δ*ica*), luego se transformó con un plásmido que llevaba el *ica* de tipo silvestre aislado de *S. aureus* Mn8m (pMuc, sobreproductor de la PNAG) o con el pMuc al que le falta el gen *icaB* (pMucΔ*icaB*), tal y como se muestra en la figura 13. La cepa de *S. aureus* 10833 (tipo silvestre) y 10833 (*picaB*) se muestran en la figura 14. La cepa 10833 (*picaB*) sobreexpresa el gen *icaB* desde un plásmido a partir del promotor constitutivo del locus *ica* de *S. aureus* Mn8m (sobreproductor de PNAG). Se cree que el gen *icaB* es la enzima responsable de desacetilar la PNAG. La delección del gen *icaB* afecta a la muerte por el Acm F598, pero no por el Acm F628. En ausencia del gen *icaB* se reduce la muerte por el Acm F598 (figura 13). La sobreexpresión del gen *icaB* da lugar a una estimulación de las muertes por el Acm F598 con poco o ningún efecto sobre las muertes por el Acm 628.

Conclusiones

Los ELISA que utilizan la PNAG modificada químicamente subrayan las diferencias de especificidad de los tres Acm totalmente humanos dirigidos contra la forma nativa de PNAG. Se encontró que el Acm 598 reconoce la PNAG y la dPNAG y, por lo tanto, es específico del esqueleto de la molécula. Los Acm F628 y F630 al parecer reconocen los epítopos específicos del acetato. Los ELISA de competición relevan que la actividad de fijación relativa de los Acm coloca al F598 en la actividad de fijación más alta seguido de F628 y luego F630. La clonación de las regiones variables revela que se usa la restricción de los genes para producir anticuerpos contra la PNAG y la dPNAG. El cambio de la región constante de los Acm de γ 2 a γ 1 dio lugar a una fijación idéntica a la PNAG, pero redujo la capacidad de fijación a la dPNAG de 2 de los 3 Acm. Finalmente, el cambio de la región constante a γ 1 dio lugar a un incremento de la capacidad que tienen los Acm para fijarse el complemento, aunque, este incremento fue más considerable para los Acm F628 y F630 que tienen una actividad de fijación más baja. La evaluación de la eficacia protectora del Acm F598g1 demostró que la administración de este producto a los ratones 24 horas antes de la exposición por vía i.v. con la cepa viva Mn8 de *S. aureus* daba lugar a una reducción de la cantidad de estafilococos en la sangre del 68% 2 horas después de la infección. La administración del Acm F598 a los ratones 4 horas antes de la exposición por vía i.p. con la cepa viva Mn8 de *S. aureus* dio lugar a un incremento de la supervivencia en comparación con los ratones tratados con el Acm de control.

Listado de secuencias

<110> The Brigham and Women's Hospital, Inc. Beth Israel Deaconess Medical Center, Inc.

45 <120> PÉPTIDOS DE FIJACIÓN A LA POLI-N-ACETIL GLUCOSAMINA (PNAG/dPNAG) Y PROCEDIMIENTOS PARA EL USO DE LOS MISMOS

<130> P9384EP00

50 <140> Sin asignar todavía

<141> 21-04-2005

ES 2 738 112 T3

<150> US 60/564.105

<151> 21-04-2004

<160> 61

5

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 124

10

<212> PRT

<212> Homo sapiens

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile His Tyr Ser Arg Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Ser Leu
65 70 75 80

Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Thr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Gly Asp Tyr Glu Asp Ala Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

<210> 2

<211> 112

ES 2 738 112 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

5

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Ser Asn Tyr Ala
20 25 30

Ile Ala Trp His Gln Gln Gln Pro Gly Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
35 40 45

Lys Val Asn Arg Asp Gly Ser His Ile Arg Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Trp Gly
85 90 95

Ala Gly Ile Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 3

<211> 124

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 738 112 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Gly Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asp Thr Tyr Tyr Glu Ser Ser Gly His Trp Phe Asp Gly Leu Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 738 112 T3

Gln Pro Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Asp Ser Glu His Ser Arg Tyr Thr
 20 25 30

Ile Ala Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
 35 40 45

Lys Val Lys Ser Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp Gly Ile Thr Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Trp Gly
 85 90 95

Pro Gly Ile Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 5

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Met Lys Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

10

ES 2 738 112 T3

Gly Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Gly Ser Asp Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser Gly Tyr Ala Tyr Asp Asp Phe Ala
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6

<211> 112

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 738 112 T3

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Ser Thr Tyr Ala
 20 25 30

Ile Ala Trp His Gln Gln Gln Pro Leu Arg Gly Pro Arg Phe Leu Met
 35 40 45

Lys Val Asn Ser Asp Gly Ser His Thr Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Ser Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Trp Gly
 85 90 95

Pro Gly Ile Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 7

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

10

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 738 112 T3

Tyr Ile His Tyr Ser Arg Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 9

<211> 16

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Asp Thr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Gly Asp Tyr Glu Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10 15

10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 10

Thr Leu Ser Ser Gly His Ser Asn Tyr Ala Ile Ala
1 5 10

20

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 11

Val Asn Arg Asp Gly Ser His Ile Arg Gly Asp
1 5 10

30 <210> 12

<211> 9

ES 2 738 112 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

5

Gln Thr Trp Gly Ala Gly Ile Arg Val
1 5

<210> 13

<211> 5

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Asn Tyr Tyr Trp Ser
1 5

15

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 14

Tyr Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

25

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 15

ES 2 738 112 T3

Asp Thr Tyr Tyr Glu Ser Ser Gly His Trp Phe Asp Gly Leu Asp Val
1 5 10 15

<210> 16

<211> 12

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Thr Leu Asp Ser Glu His Ser Arg Tyr Thr Ile Ala
1 5 10

10

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 17

Val Lys Ser Asp Gly Ser His Ser Lys Gly Asp
1 5 10

20

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 18

Gln Thr Trp Gly Pro Gly Ile Arg Val
1 5

30

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

ES 2 738 112 T3

<213> Homo Sapiens

<400> 19

Asn Phe Gly Ile Ser
1 5

5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Homo Sapiens

<400> 20

Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15

Gly

15

<210> 21

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 21

Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser Gly Tyr Ala Tyr Asp Asp Phe Ala Ile
1 5 10 15

25

<210> 22

<211> 2

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 22

ES 2 738 112 T3

Thr Leu Ser Ser Gly His Ser Thr Tyr Ala Ile Ala
1 5 10

<210> 23

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Val Asn Ser Asp Gly Ser His Thr Lys Gly Asp
1 5 10

10

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 24

Gln Thr Trp Gly Pro Gly Ile Arg Val
1 5

20

<210> 25

<211> 372

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25

<400> 25

ES 2 738 112 T3

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc ctteggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tttctggtgg ctccatcagt ggttactact ggagttggat ceggcagccc 120
ccaggggaagg gactggagtg gattgggtat attcattata gtaggagcac caactccaac 180
cccgccctca agagtcgagt caccatatca tcagacacgt ccaagaacca gctctccctg 240
agactgagct cagtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatacctat 300
tactatgata gtggtgatta tgaggatgct tttgatattt ggggccaagg gacaatggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 26

<211> 336

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 26

cagcttgtgc tgactcagtc gccctctgcc tctgcctccc tgggagcctc ggtcaagctc 60
acctgcactc tgagcagtgg ccacagcaac tacgccatcg cttggcatca gcagcagcca 120
gggaagggcc ctgcctactt gatgaagggt aacagagatg gcagccacat cagggggggac 180
gggatccctg atcgcttctc aggctccacc tctggggctg agcgttacct caccatctcc 240
agtctccagt ctgaagatga ggctgactat tactgtcaga cctgggggcgc tggcattcga 300
gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggt 336

10

<210> 27

<211> 372

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 27

ES 2 738 112 T3

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acgtgcactg tctctggtgg ctccatcagt aattactact ggagttggat ccggcagtec 120
 ccagggaggg gactggagtg gattgggtat atccattata gtgggagcac caactccaat 180
 ccātccctca agagtcgagt caccatatca gttgacacgt ccaagaacca ggtctccctg 240
 aagctgggct ctgtgaccgc tgcggacacg gccatatatt actgtgagag agatacttac 300
 tatgaaagta gtggtcattg gttcgacggt ttggacgtct ggggccaagg gacctcggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 28

<211> 333

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 28

cagcctgtgc tgactcagtc gccctctgcc tctgcctccc tgggagcctc ggtcaagctc 60
 acctgcactc tggacagtga acacagcaga tacaccatcg catggcatca gcagcagcca 120
 gagaagggcc ctoggtacct gatgaaggtt aagagtgatg gcagtcacag caagggggac 180
 ggcattactg atcgcttctc aggctccagc tctggggctg agcgctacct caccatctcc 240
 agcctccagt ctgaggatga ggctgactat tactgtcaga cttggggccc tggcattcga 300
 10 gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc cta 333

<210> 29

<211> 372

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 29

ES 2 738 112 T3

caggttcagc tgggagctgag atgaagagggc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc aactttggta tcagttgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gataggatgg gtcagcactt acaatgggctg cacaaattat 180
 gcacagaagt tccggggcag agtcaccatg accacagaca catccacgaa cacagcgtac 240
 atggaactga ggagcctggg atctgacgac acggccgtct tttactgtgc gagagattac 300
 tatgagacta gtggttacgc ctatgatgat tttgcatct ggggccaagg gacattggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 30

<211> 336

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 30

cagcttgtgc tgactcaate gccctctgcc tctgcttccc tgggagcctc ggtcaagctc 60
 acctgcactc tgagcagtg gacagcacc tacgccatcg cgtggcatca gcagcagcca 120
 ctgagggggtc ctcgtttctt gatgaaagtc aacagtgatg gcagccacac caagggggac 180
 gggatccctg atcgcttctc aggctccagt tctggggctg agcgctacct ctccatctcc 240
 agcctccagt ctgaagatga gtctgactat tactgtcaga cgtggggccc tggcattcga 300
 gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggt 336

10

<210> 31

<211> 15

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 31

ggttactact ggagt

20 <210> 32

<211> 48

ES 2 738 112 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 32

5 tatattcatt atagtaggag caccaactcc aacccccgcc tcaagagt

<210> 33

<211> 48

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 33

gatacctatt actatgatag tggtgattat gaggatgctt ttgatatt

15 <210> 34

<211> 36

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 34

actctgagca gtggccacag caactacgcc atcgct

<210> 35

<211> 33

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 35

gttaacagag atggcagcca catcaggggg gac

30

<210> 36

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

35

<400> 36

ES 2 738 112 T3

cagacctggg gcgctggcat tcgagtg

<210> 37

<211> 15

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 37

aattactact ggagt

10

<210> 38

<211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 38

tatatcatt atagtgggag caccaactcc aatccatccc tcaagagt

<210> 39

20

<211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 39

25

gatactfact atgaaagtag tggcattgg ttcgacggtt tggacgtc

<210> 40

<211> 36

<212> ADN

30

<213> Homo sapiens

<400> 40

actctggaca gtgaacacag cagatacacc atcgca

35

<210> 41

<211> 33

ES 2 738 112 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 41

5 gttaagagtg atggcagtca cagcaagggg gac

<210> 42

<211> 27

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 42

cagactggg gccctggcat tcgagtg

15 <210> 43

<211> 15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 43

aacttgga tcagt

<210> 44

<211> 51

25 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 44

tggtcagca ctacaatgg tcgcacaaat tatgcacaga agttccgggg c

30

<210> 45

<211> 45

<212> ADN

<213> Homo sapiens

35

<400> 45

ES 2 738 112 T3

gattactatg agactagtg ttacgcctat gatgatttg cgatc

<210> 46

<211> 36

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 46

actctgagca gtggcacag cacctacgcc atcgcg

10

<210> 47

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 47

gtcaacagtg atggcagcca caccaagggg gac

<210> 48

20

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 48

25

cagacgtggg gccctggcat tcgagtg

<210> 49

<211> 31

<212> ADN

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 49

35

gaccgagggg gcagccttg gctgacctag g 31

<210> 50

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 50

agatctctca ccatggcatg gatccctctc ttc 33

10

<210> 51

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 51

20

tgggcccttg gtgctagctg aggagac 27

<210> 52

<211> 27

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

30

<400> 52

gtcgacatga aacatctgtg gttcttc 27

<210> 53

<211> 33

35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 53

5 agatctctca ccatggccrg cttccctctc ctc 33

<210> 54

<211> 22

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

15 <400> 54

gtcgacatgg actggacctg ga 22

<210> 55

<211> 126

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

ES 2 738 112 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile His Tyr Ser Arg Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Ser Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Thr Tyr Tyr Tyr Asp Ser Gly Asp Tyr Glu Asp Ala Phe Asp
 100 105 110
 Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

<210> 56

<211> 378

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 56

ES 2 738 112 T3

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tttctgggtg ctccatcagt ggttactact ggagttggat ccggcagccc 120
ccaggaaggg gactggagtg gattgggtat attcattata gtaggagcac caactccaac 180
cccgccctca agagtcgagt caccatatca tcagacacgt ccaagaacca gctctccctg 240
agactgagct cagtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatacctat 300
tactatgata gtggtgatta tgaggatgct tttgatattt ggggccaagg gacaatggtc 360
accgtctcct cagctagc 378

<210> 57

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

ES 2 738 112 T3

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Ser Asn Tyr Ala
20 25 30
Ile Ala Trp His Gln Gln Gln Pro Gly Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
35 40 45
Lys Val Asn Arg Asp Gly Ser His Ile Arg Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Trp Gly
85 90 95
Ala Gly Ile Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val
115 120

<210> 58

<211> 130

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

10

ES 2 738 112 T3

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Gly Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Thr Tyr Tyr Glu Ser Ser Gly His Trp Phe Asp Gly Leu Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125

Gly Pro
 130

<210> 59

<211> 381

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 59

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acgtgcactg tctctggtgg ctccatcagt aattactact ggagttggat ccggcagtc 120

ccagggaggg gactggagtg gattgggtat atccattata gtgggagcac caactccaat 180

ccatccctca agagtcgagt caccatatca gttgacacgt ccaagaacca ggtctccctg 240

aagctgggct ctgtgaccgc tgcggacacg gccatatatt actgtgcgag agatacttac 300

tatgaaagta gtggtcattg gttcgacggt ttggacgtct ggggccaagg gacctcggtc 360

accgtctcct cagctagcac c 381

10

ES 2 738 112 T3

<210> 60

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 60

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Ser Thr Tyr Ala
20 25 30

Ile Ala Trp His Gln Gln Gln Pro Leu Arg Gly Pro Arg Phe Leu Met
35 40 45

Lys Val Asn Ser Asp Gly Ser His Thr Lys Gly Asp Gly Ile Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Ser Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Trp Gly
85 90 95

Pro Gly Ile Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val
115 120

<210> 61

10

<211> 375

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 61

ES 2 738 112 T3

cagcttgtgc	tgactcaatc	gccctctgcc	tctgcttccc	tgggagcctc	ggtcaagctc	60
acctgcactc	tgagcagtgg	gcacagcacc	tacgccatcg	cgtggcatca	gcagcagcca	120
ctgaggggtc	ctcgtttctt	gatgaaagtc	aacagtgatg	gcagccacac	caagggggac	180
gggatccctg	atcgcttctc	aggctccagt	tctggggctg	agcgctacct	ctccatctcc	240
agcctccagt	ctgaagatga	gtctgactat	tactgtcaga	cgtggggccc	tggcattcga	300
gtgttcggcg	gagggaccaa	gctgaccgtc	ctaggtcagc	ccaaggctgc	cccatcggtc	360
acctgttccc	gcctc					375

REIVINDICACIONES

1. Un vector que comprende:
 - una molécula de ácido nucleico aislada que tiene las secuencias de nucleótidos correspondientes respectivamente a CDR 1-3 de la cadena pesada SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, y SEQ ID NO: 33; y
- 5 una molécula de ácido nucleico aislada que tiene las secuencias de nucleótidos correspondientes respectivamente a CDR 1-3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36,
 - en donde el vector codifica un anticuerpo de fijación a la poli-N-acetil glucosamina/dPNAG anti-estafilocócica o fragmento de anticuerpo.
2. El vector de la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 tiene una secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 25 y la molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 tiene una secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 26.
3. El vector de la reivindicación 1, en donde las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33 codifican una región variable de la cadena pesada del anticuerpo de fijación a la poli-N-acetil glucosamina/dPNAG estafilocócica (anticuerpo de fijación a la PNAG/dPNAG) y las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36 codifican una región variable de la cadena ligera del anticuerpo de fijación a la PNAG/dPNAG, comprendiendo la región variable de la cadena pesada una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y comprendiendo la región variable de la cadena ligera una CDR1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, una CDR2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una CDR3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.
4. El vector de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el vector es un vector de expresión.
5. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo de fijación a la poli-N-acetil glucosamina/dPNAG anti-estafilocócica o un fragmento de fijación al antígeno del mismo y deriva de un hibridoma que tiene N° de acceso PTA-5931.
6. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica
 - (a) una región variable de la cadena pesada de anticuerpo de poli-N-acetil glucosamina/dPNAG estafilocócica (anticuerpo de fijación a la PNAG/dPNAG) y deriva de un hibridoma que tiene N° de acceso PTA-5931 y
 - (b) una región variable de la cadena ligera de anticuerpo poli-N-acetil glucosamina/dPNAG estafilocócica (anticuerpo de fijación a la PNAG/dPNAG) y deriva de un hibridoma que tiene N° de acceso PTA-5931.
7. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 6 que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 25 correspondiente a una región variable de la cadena pesada.
8. La molécula de ácido nucleico aislada de la reivindicación 6 que tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 26 correspondiente a una región variable de la cadena ligera.
9. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica
 - (a) una región variable de la cadena pesada de anticuerpo de poli-N-acetil glucosamina/dPNAG estafilocócica y tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 25, y
 - (b) una región variable de la cadena ligera de anticuerpo de poli-N-acetil glucosamina/dPNAG estafilocócica y tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 26.
10. Una célula aislada que produce un anticuerpo monoclonal de poli-N-acetil glucosamina/dPNAG anti-estafilocócica (anticuerpo monoclonal de PNAG/dPNAG) y que tiene N° de acceso PTA-5931 en la ATCC.
11. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende:
 - una región de la cadena pesada que comprende secuencias de CDR1 de la cadena pesada, CDR2 de la cadena pesada y CDR3 de la cadena pesada que comprenden secuencias de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33, respectivamente; y
 - una región de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1 de la cadena ligera, CDR2 de la cadena ligera y CDR3 de la cadena ligera que comprenden secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y SEQ ID NO: 36, respectivamente,

en donde el ácido nucleico aislado codifica un anticuerpo de fijación a la poli-N-acetil glucosamina/dPNAG anti-estafilocócica o fragmento de anticuerpo.

12. Una primera molécula de ácido nucleico aislada que codifica una región variable de la cadena pesada de anticuerpo de poli-N-acetil glucosamina/dPNAG estafilocócica (anticuerpo de fijación a la PNAG/dPNAG) y deriva de un hibridoma que tiene N° de acceso PTA-5931, y

una segunda molécula de ácido nucleico aislada que codifica una región variable de la cadena ligera de anticuerpo de poli-N-acetil glucosamina/dPNAG estafilocócica (anticuerpo de fijación a la PNAG/dPNAG) y deriva de un hibridoma que tiene N° de acceso PTA-5931.

13. Una primera molécula de ácido nucleico aislada que codifica una región variable de la cadena pesada de anticuerpo de poli-N-acetil glucosamina/dPNAG estafilocócica y tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 25, y una segunda molécula de ácido nucleico aislada que codifica una región variable de la cadena ligera de anticuerpo de poli-N-acetil glucosamina/dPNAG estafilocócica y tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 26.

14. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26.

15. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de las reivindicaciones 5 a 9 y 11 a 13 operativamente fijado a un promotor.

16. Una célula hospedadora transformada o transfectada con el vector de expresión de la reivindicación 4 o reivindicación 15.

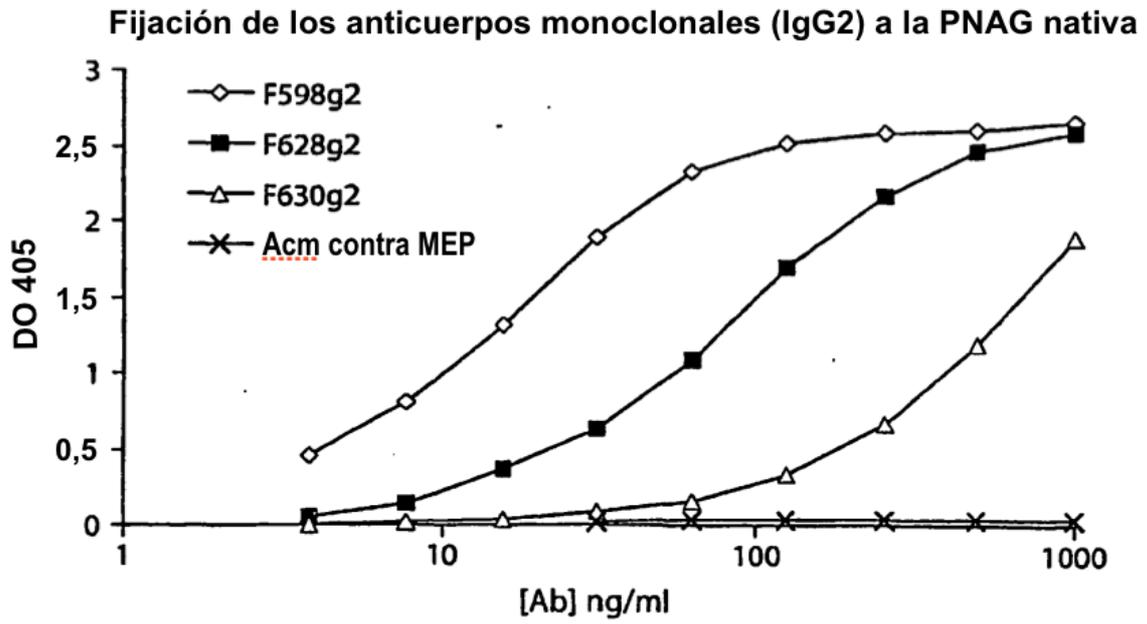


Fig. 1

Fijación de los anticuerpos monoclonales (IgG2) a la dPNAG

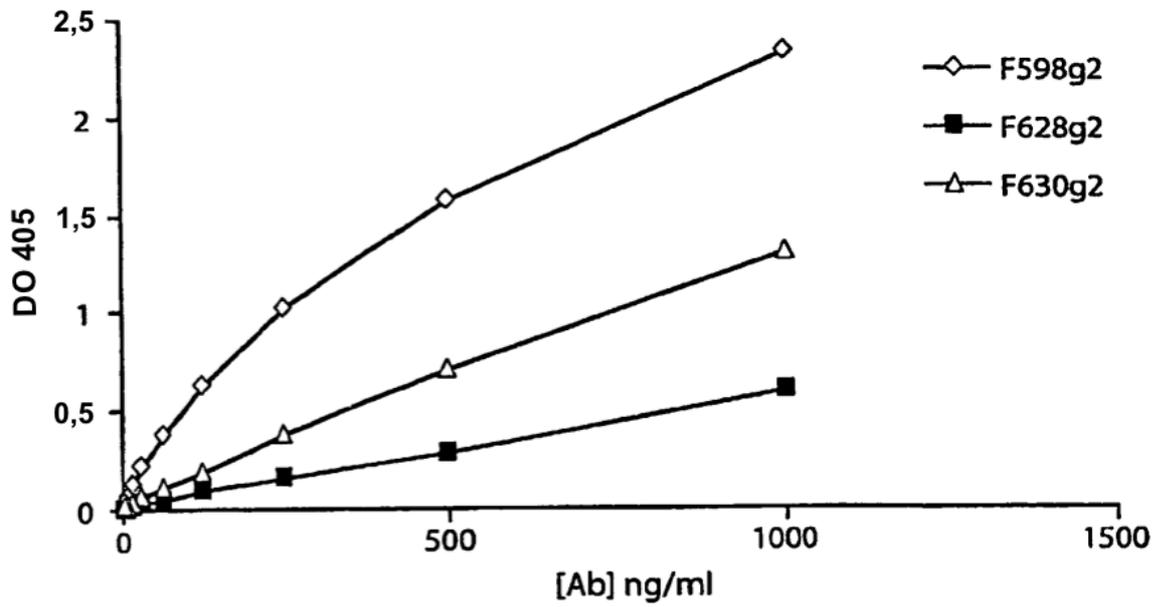


Fig. 2

ELISA de competición de PNAG con anticuerpos monoclonales IgG2

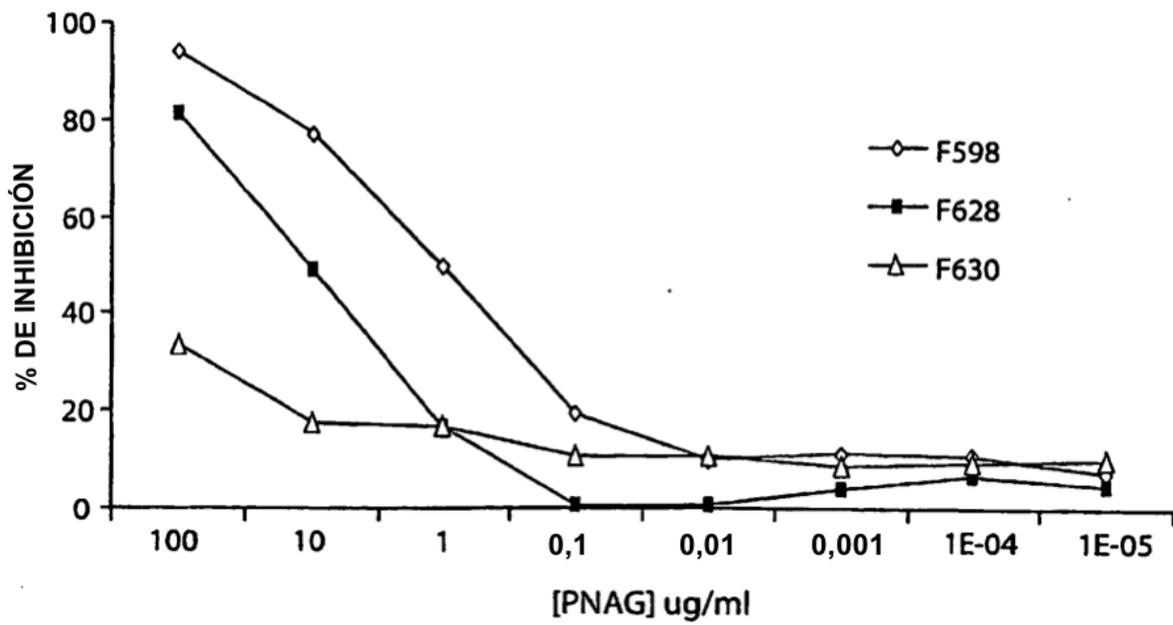


Fig. 3

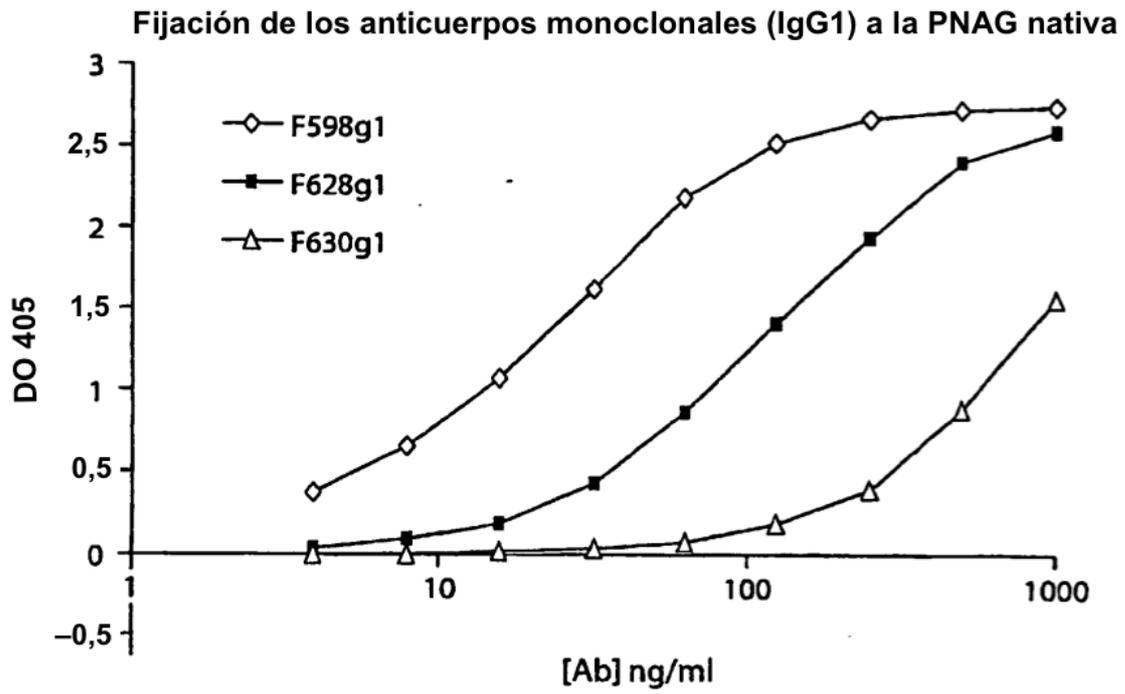


Fig. 4

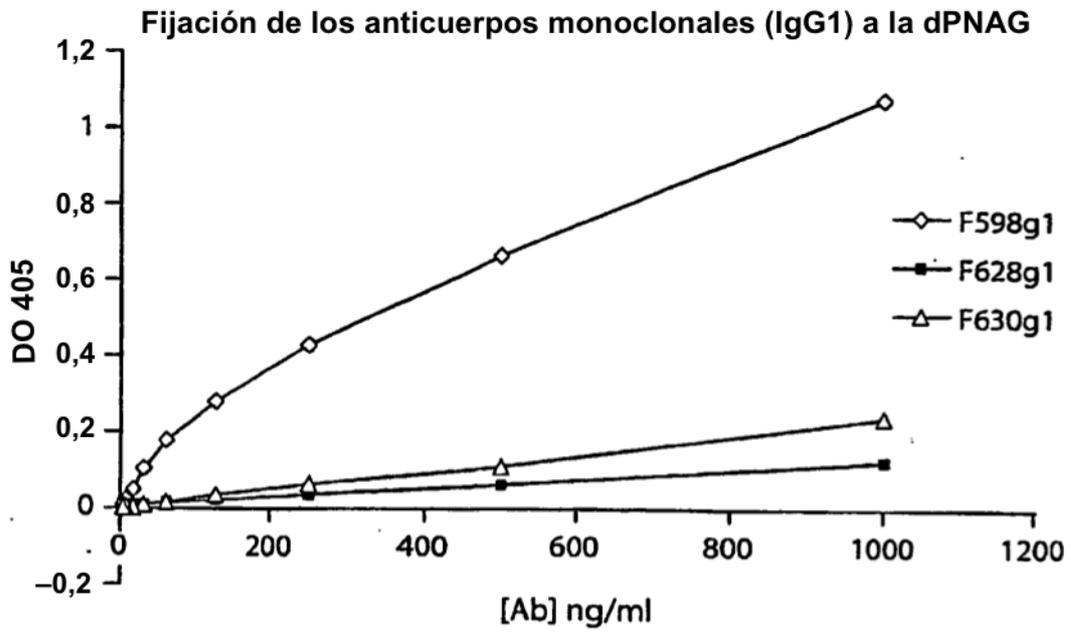


Fig. 5

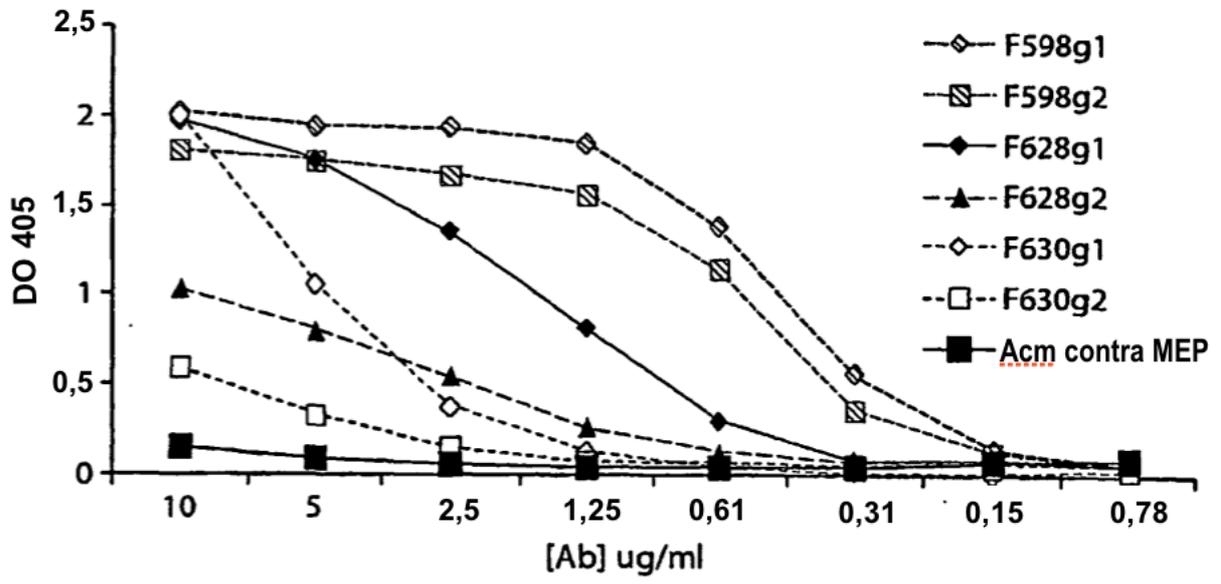


Fig.6

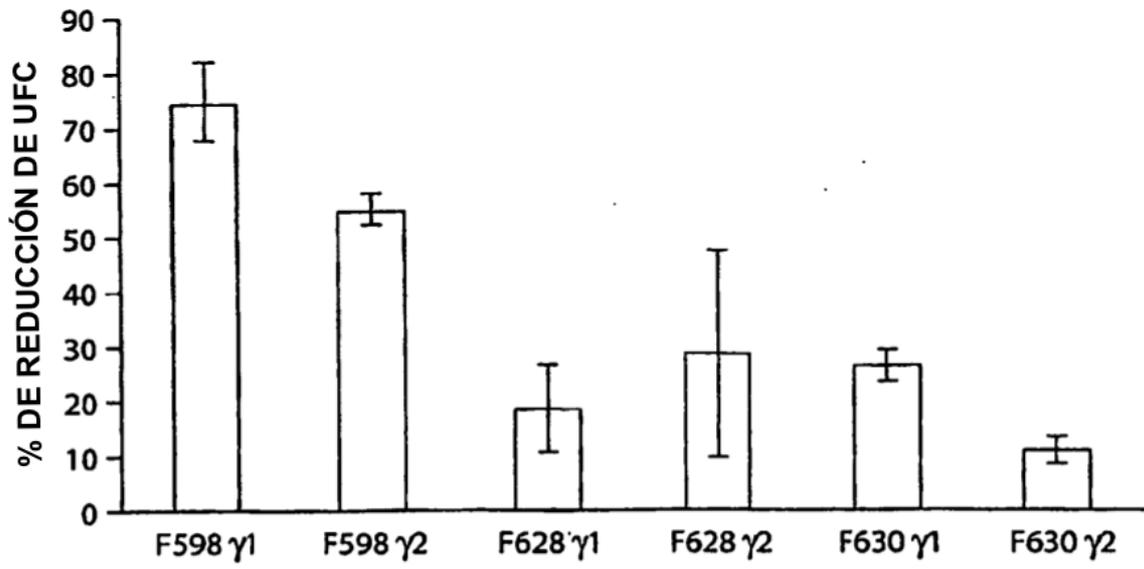


Fig. 7

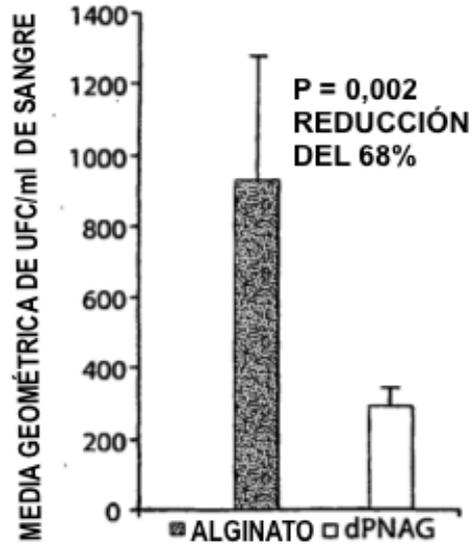


Fig. 8A

Log₁₀ UFC/ml DE SANGRE EN LOS RATONES TRATADOS CON EL Acm HUMANO ANTI-PNAG Y DE CONTROL

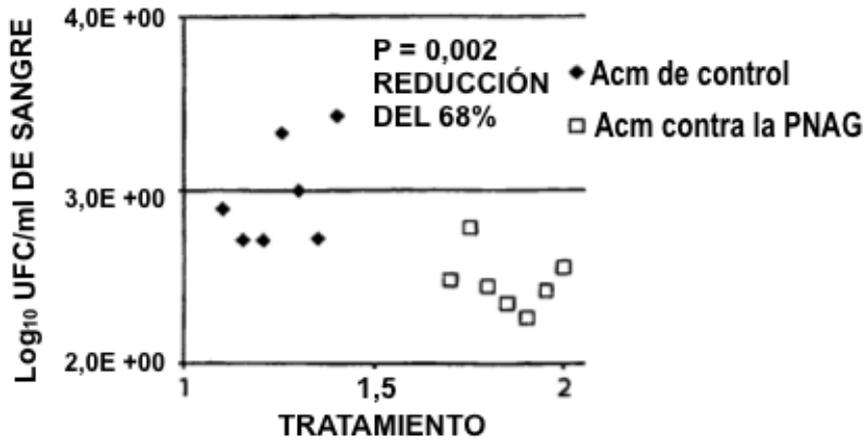


Fig. 8B

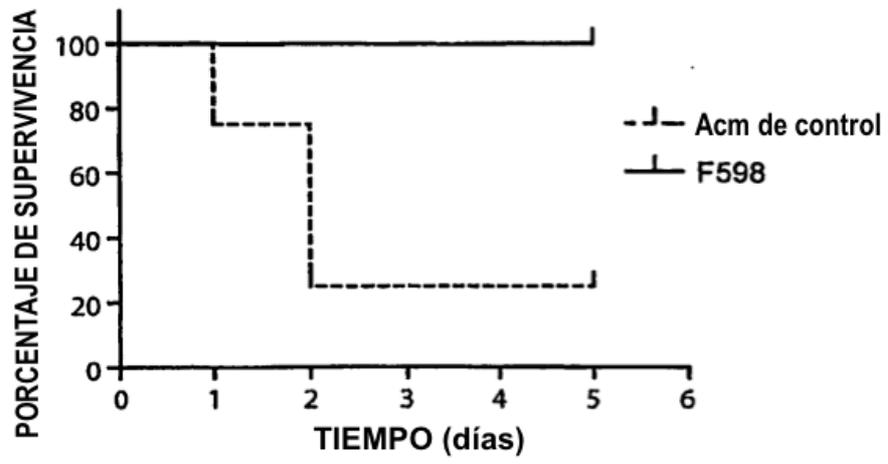


Fig. 8C



Fig.9

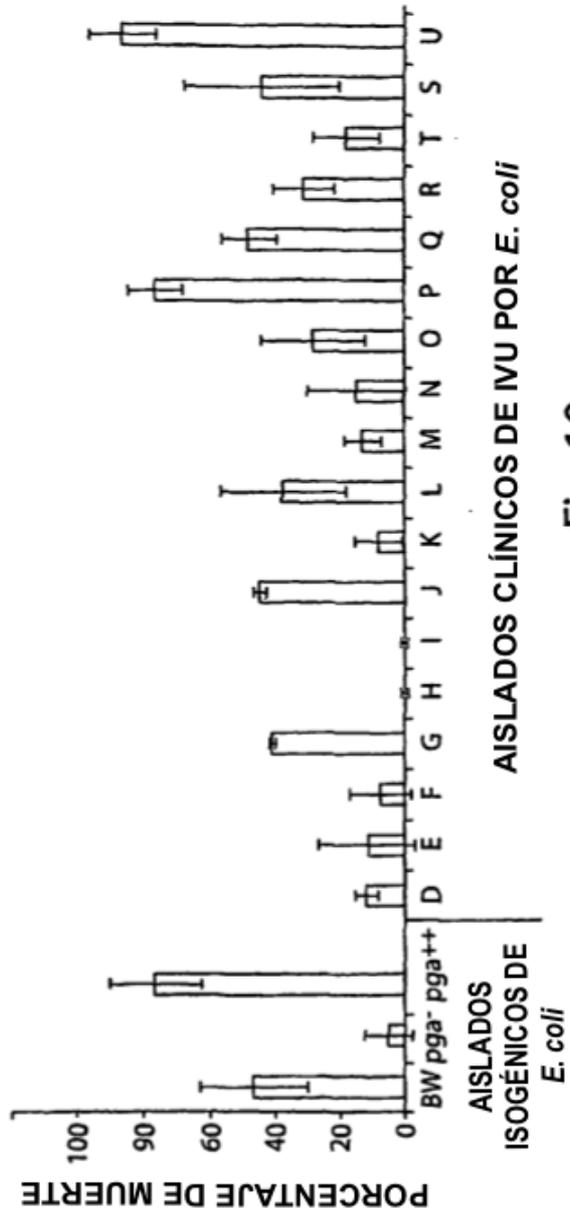
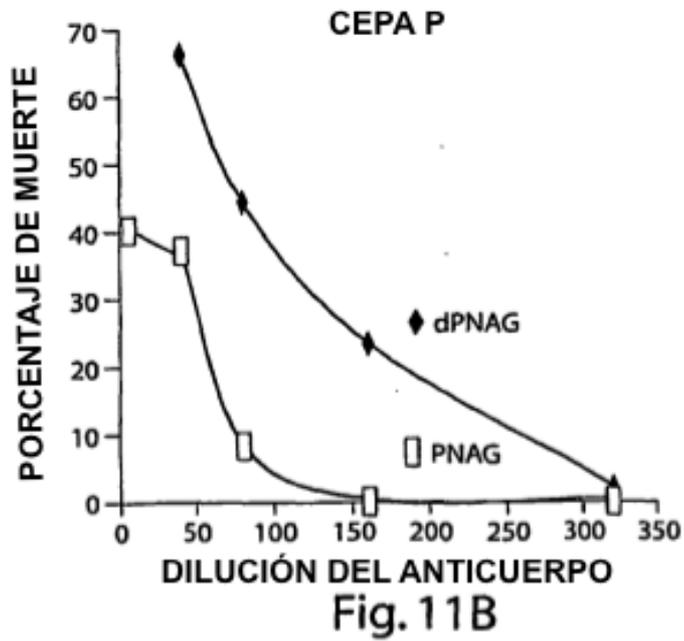
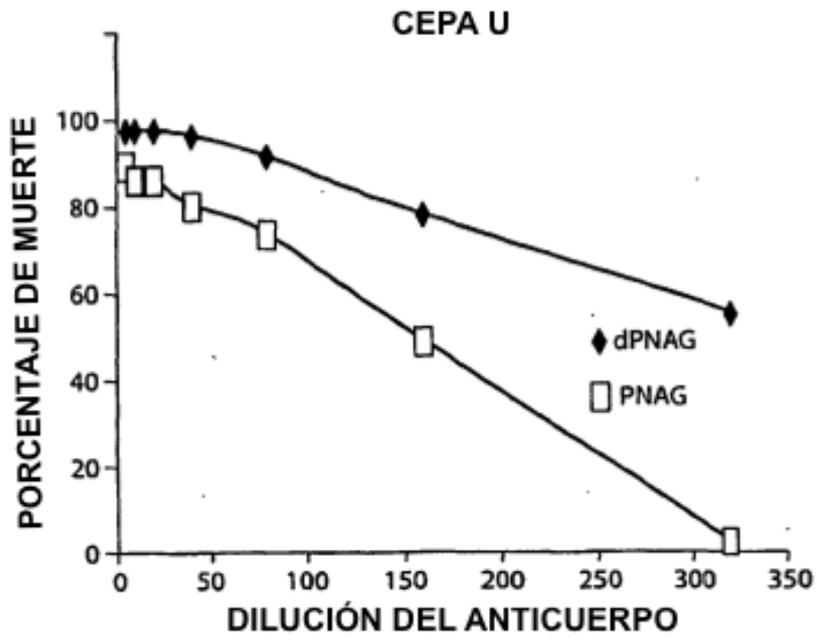


Fig. 10



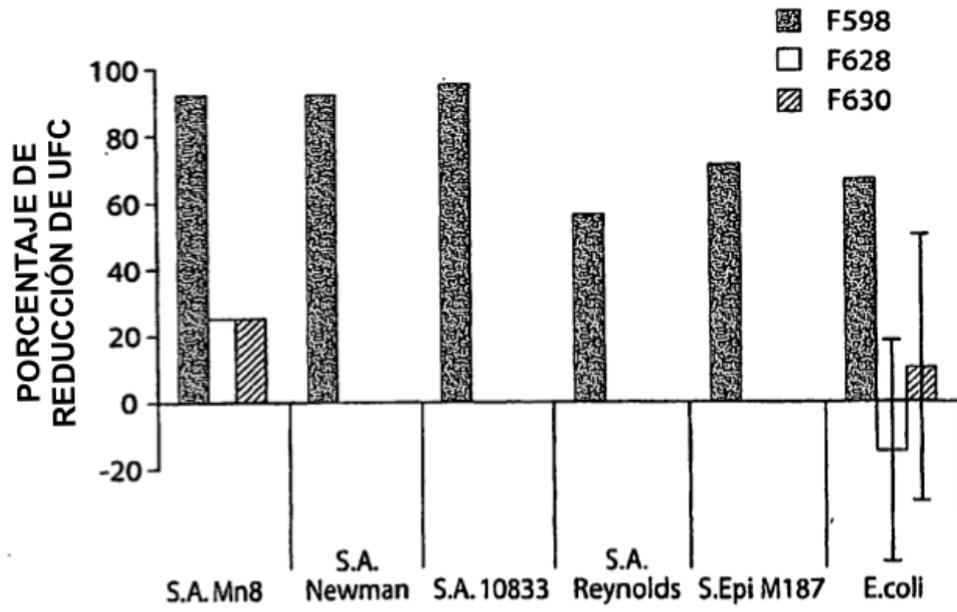


Fig. 12

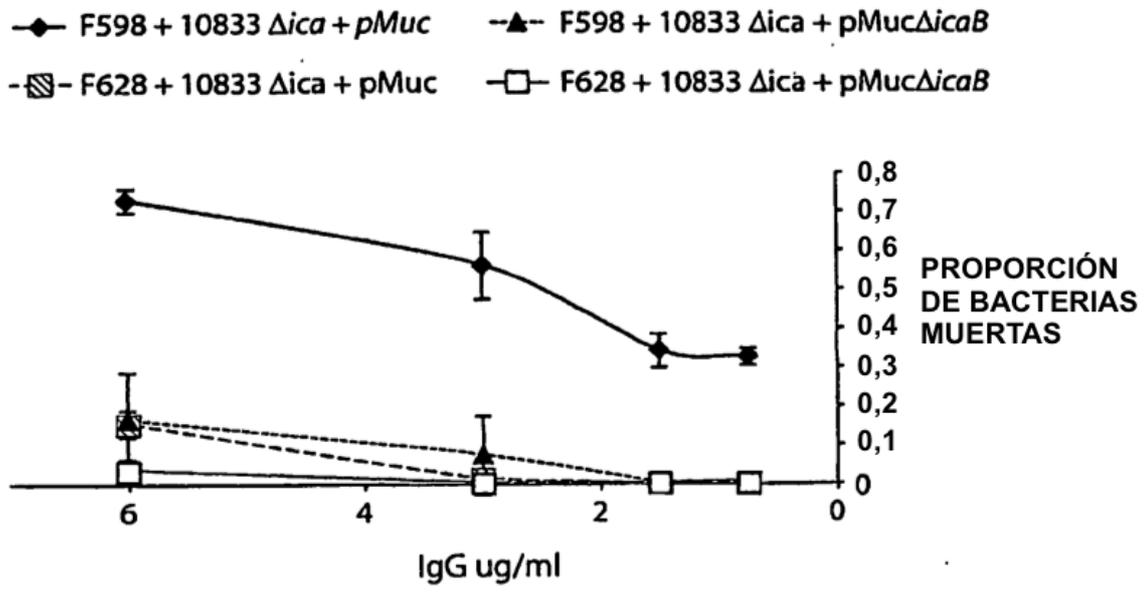


Fig. 13

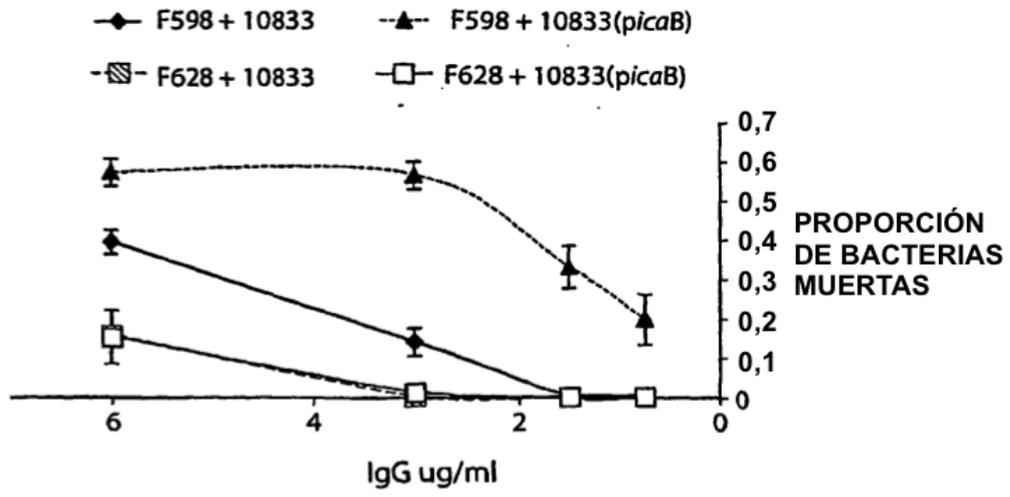


Fig. 14