

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 920**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2010 PCT/BR2010/000263**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2011 WO11017791**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2010 E 10807822 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2476702**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra la proteína PBP2a y secuencias homólogas para el tratamiento de infecciones e inmunodiagnóstico de bacterias del filo Firmicutes**

30 Prioridad:

10.08.2009 BR PI0976200

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

15.07.2020

73 Titular/es:

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (100.0%)
Avenida Brasil 4365, Manguinhos
21045-900 Rio de Janeiro, BR**

72 Inventor/es:

**SENNÁ, JOSÉ PROCÓPIO MORENO;
QUEIROZ, JOÃO LUIZ SAMPAIO;
BATOREU, NADIA MARIA y
TEIXEIRA, MARIA DA GLÓRIA MARTINS**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 773 920 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

Anticuerpos monoclonales contra la proteína PBP2a y secuencias homólogas para el tratamiento de infecciones e inmunodiagnóstico de bacterias del filo *Firmicutes*

5 **Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a la proteína PBP2a y a otras proteínas que presentan secuencias homólogas a PBP2a, incluidos los patógenos *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina - MRSA, *Staphylococcus* negativos a la coagulasa, *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus* spp., y cualquier otra bacteria que posea PBP2a o secuencias homólogas a esta proteína.

15 La invención desvela además el uso de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a la proteína PBP2a y a otras proteínas que presentan secuencias homólogas a PBP2a en un inmunodiagnóstico complementario para la detección de resistencia a betalactámicos.

Fundamentos de la invención

20 Las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) son una causa de gran preocupación para los médicos, presentando tasas de mortalidad y morbilidad superiores a las de las infecciones causadas por estafilococos sensibles a la meticilina (1). Adicionalmente, estas infecciones causan un mayor tiempo de hospitalización y un mayor gasto de antimicrobianos, lo que lleva a un mayor coste en el tratamiento de pacientes infectados por este patógeno (1).

25 La vancomicina ha sido el antimicrobiano de primera elección para el tratamiento de infecciones causadas por MRSA. Sin embargo, el creciente aislamiento de las cepas de MRSA en comunidades de los Estados Unidos y Australia (2, 3, 4), junto con la identificación de cepas de MRSA con resistencia intermedia a la vancomicina en Japón, Estados Unidos (5) y Brasil (6) hacen que la escena actual se vuelva más grave. La descripción de las cepas de MRSA totalmente resistentes a la vancomicina en 2004 (7) ha causado una gran preocupación en la comunidad médico-científica. En la actualidad, el MRSA representa un fuerte candidato para convertirse en la temible "superbacteria o superbicho", un patógeno resistente a todos los medicamentos disponibles en la actualidad.

30 Normalmente, las tasas de prevalencia de MRSA (proporción de todas las infecciones por *S. aureus* causadas por MRSA) en infecciones hospitalarias están aumentando gradualmente en las últimas décadas. En un estudio realizado por Jarvis et al., incluyendo 1268 UCI (unidades de cuidados intensivos) en 337 hospitales en los Estados Unidos, el número de infecciones por MRSA en las UCI cambió de 660 a 2.184 casos y la prevalencia aumentó de 35 % a 64,4 % (8). En Japón, las tasas de prevalencia de infecciones hospitalarias (*Hospital Infections*, HI) causadas por MRSA pueden presentar valores preocupantes, del 60 % al 90 % (9). En estudios realizados en los Estados Unidos, el percentil cambió del 2 % en 1974 al 50 % en 1997 (10, 11) y, en algunos hospitales de Estados Unidos, más del 80 % de las HI están causadas por MRSA (12). En Inglaterra, la prevalencia aumentó del 1,5 % al 15,2 % entre 1989 y 1995 y ahora (2004) la estimación es del 41,5 % (13).

45 Además de las altas tasas de prevalencia, especialmente en la enseñanza y hospitales de gran tamaño, el MRSA es considerado como el principal patógeno que causa brotes epidémicos en hospitales brasileños (14). En 1986, más del 50 % de las cepas de *S. aureus* de origen hospitalario aisladas en pacientes de hospitales universitarios de Sao Paulo eran resistentes a la meticilina y, en 1993, la incidencia de MRSA en el Hospital Pediátrico de la Escuela de Medicina Paulista fue del 70 % (15). En un estudio realizado en hospitales de Belo Horizonte, Resende et al. (16) señalaron una prevalencia del 71 % de MRSA.

50 Las cepas de MRSA presentan una proteína de unión a la penicilina con afinidad muy baja por los antimicrobianos en la clase de betalactámicos, tales como PBP2a (17). En presencia de esta enzima, que está codificada por el gen *mecA*, la bacteria logra sintetizar el peptidoglicano, incluso en presencia de betalactámicos. Esta enzima también se puede encontrar en *Staphylococcus* negativo a la coagulasa y en *Staphylococcus sciuri*, una bacteria presente en la flora normal de los perros. Además de la resistencia a los betalactámicos, las cepas hospitalarias de MRSA presentan resistencia a la mayoría de las otras clases de antimicrobianos disponibles, quedando el uso de glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina) como tratamiento de primera elección.

60 Dos estudios que usaron la vacuna de ADN contra PBP2a mostraron que esta proteína es inmunogénica y que la respuesta inmunitaria obtenida pudo conferir protección contra MRSA en ensayos realizados en modelo murino (18, 19). Sin embargo, se sabe que, en infecciones hospitalarias, la mayoría de los pacientes están inmunodeprimidos (20). En estos casos, una vacuna no podría generar anticuerpos protectores a su debido tiempo para controlar una infección bacteriana.

Inmunogenicidad frente a PBP2a

65 PBP2a es una enzima multimodular de clase II según la clasificación de Goffin y Ghuysen (40). Esta enzima de 76

kilodalton está compuesta por una región de unión a la membrana, un dominio no transpeptidasa y un dominio transpeptidasa, que contiene un núcleo activo de 4 aminoácidos (STQK), responsable de las reacciones de transpeptidación bacteriana (20 bis Ryfell, 1990).

5 Los estudios actuales con la vacuna de ADN contra PBP2a muestran que los resultados de la reducción bacteriana (cuantificación renal) en animales inmunizados sometidos a exposición por infección sistémica fueron de 3 a 4 veces en el trabajo de Ohwada et al. y de 1.000 veces en el trabajo de Senna et al. Los autores de estos estudios usaron la secuencia completa (a excepción de la región de fijación a la membrana) del gen *mecA* y un fragmento interno del dominio transpeptidasa, respectivamente.

10 Saito, M. et al. ("Immunological detection of penicillin-binding protein 2' of methicillin-resistant staphylococci by using monoclonal antibodies prepared from synthetic peptides"; Journal of Clinical Microbiology, vol. 33, no. 9) desvela anticuerpos monoclonales específicos para la proteína PBP2a y usos de los mismos en el diagnóstico para detectar infección con MRSA.

15 El documento WO 88/02028 desvela anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a PBP2' y el uso de dichos anticuerpos en el tratamiento de infecciones por estafilococos.

20 Pero, de acuerdo con lo mencionado anteriormente, una vacuna no puede generar anticuerpos protectores a su debido tiempo para controlar una infección bacteriana. Así, en caso de infecciones por MRSA, la administración de anticuerpos monoclonales anti-PBP2a es la terapia más adecuada para tratar estas infecciones.

Sumario de la invención

25 El objeto de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a la proteína PBP2a, caracterizado por que comprende, en la región variable de la cadena ligera, una región CDR1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6, una región CDR2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7 y una región CDR3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO:8, y, en la región variable de la cadena pesada, una región CDR1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12, una región CDR2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 13 y una región CDR3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO:14.

35 La invención proporciona además un anticuerpo monoclonal aislado que se une a la proteína PBP5 de *Enterococcus* spp., caracterizado por que comprende, en la región variable de la cadena ligera, una región CDR1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6, una región CDR2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7 y una región CDR3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO:8, y, en la región variable de la cadena pesada, una región CDR1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12, una región CDR2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 13 y una región CDR3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO:14.

40 La invención también proporciona anticuerpos de la invención para su uso como medicamento. Los anticuerpos de la invención también proporcionan el uso en el tratamiento o la prevención de una infección por bacterias del filo Firmicutes.

45 El objetivo principal de la presente invención es proporcionar anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a la proteína PBP2a (SEQ ID NO.:1) y a otras proteínas que presentan secuencias homólogas a PBP2a, incluidos los patógenos *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina - MRSA, *Staphylococcus* negativos a la coagulasa, *Staphylococcus sciuri*, *Enterococcus* spp., y cualquier otra bacteria que posea PBP2a o secuencias homólogas a esta proteína.

50 Además se desvela el uso de anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a la proteína PBP2a y otras proteínas que presentan secuencias homólogas a PBP2a en un inmunodiagnóstico complementario para la detección de resistencia a betalactámicos.

55 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención están representados por secuencias SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 7, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 9, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13, SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15, SEQ ID NO.: 16 y la SEQ ID NO.: 17.

Breve descripción de la figura

60 La Figura 1 muestra la prueba inmunoenzimática (ELISA) de sueros de animales inmunizados para producir anticuerpos anti-PBP2a.

65 La Figura 2 muestra el resultado de un gel de poliacrilamida con muestras en bruto y muestras después de la purificación.

La Figura 3 muestra la prueba de inmunotransferencia de lisados de MRSA y MSSA contra un sobrenadante que contiene anticuerpos monoclonales anti-PBP2a.

5 La Figura 4 es una representación de los resultados de citometría de flujo de bacterias MRSA (CEB) y MSSA, incubadas con anticuerpo monoclonal anti-PBP2a y marcadas con ficoeritrina (PE).

La Figura 5 muestra la prueba de protección *in vitro* (CMI - concentración mínima inhibitoria) conferida por el anticuerpo monoclonal purificado anti-PBP2a y la vancomicina contra un inóculo de diferentes cepas de MRSA.

10 La Figura 6A muestra resultados de cuantificación renal en animales tratados y no tratados con el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a, sometidos a infección sistémica con una dosis subletal de cepa CEB MRSA.

15 La Figura 6B muestra resultados de cuantificación renal en animales tratados y no tratados con el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a, sometidos a infección sistémica con una dosis subletal de cepa ibérica MRSA (clon epidémico europeo).

20 La Figura 6C muestra resultados de cuantificación renal en animales tratados y no tratados con el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a, sometidos a infección sistémica con una dosis subletal de cepa WB79 CA-MRSA (cepa de la comunidad brasileña).

La Figura 7A muestra la curva de supervivencia de animales tratados (protegidos) y no tratados (control) después de la infección por una dosis bacteriana letal (MRSA CEB).

25 La Figura 7B muestra la curva de supervivencia de animales tratados (protegidos) y no tratados (control) después de la infección por una dosis bacteriana letal (MRSA ibérico).

La Figura 7C muestra la curva de supervivencia de animales tratados (protegidos) y no tratados (control) después de la infección por una dosis bacteriana letal (WB79 CA-MRSA).

30 La Figura 8A muestra la cuantificación bacteriana en riñones de animales tratados con anticuerpo monoclonal anti-PBP2a, vancomicina y asociación anticuerpo + vancomicina y animales no tratados después de la infección con bacterias (MRSA CEB).

35 La Figura 8B muestra la cuantificación bacteriana en riñones de animales tratados con anticuerpo monoclonal anti-PBP2a.

Las Figuras 9 muestran la interacción entre PBP2a recombinante (antígeno) y los anticuerpos monoclonales clon 38 (Figura 9A) y el clon 10 (Figura 9B).

40 La Figura 10 es un gráfico del segundo análisis por citometría de flujo de muestras de MRSA en presencia de anticuerpo anti-PBP2a marcado con FITC.

45 La Figura 11 muestra el resultado de la protección *in vitro* conferida por el anticuerpo contra la cepa de enterococos VRE.

La Figura 12 se refiere a DL₅₀ y dosis letales para la determinación de infección intraperitoneal.

50 La Figura 13 muestra el resultado de eficacia de la protección *in vivo* de anticuerpos monoclonales anti-PBP2a y PBP5 contra enterococos contra la infección sistémica.

Descripción detallada de la invención

55 La aparición de infecciones por bacterias multirresistentes a los antimicrobianos presenta un aumento alarmante. La prevalencia de infecciones hospitalarias causadas por MRSA ha aumentado en todas partes del mundo, presenta una alta morbilidad y causa un alto coste debido al uso intensivo de antimicrobianos y al período más largo de hospitalización del paciente (24). El tratamiento basado en quimioterapia ha estado mostrando signos de agotamiento, con la aparición de muy pocos medicamentos realmente novedosos y eficientes en el mercado (25).

60 En este contexto, la inmunoterapia pasiva (re)aparece como una alternativa prometedora, presentando una gama de características ventajosas en comparación con la quimioterapia convencional: entre ellas, la menor toxicidad, mayor semivida plasmática (que facilita el tratamiento mediante la reducción de la dosis y quizás un menor coste final del tratamiento), y, especialmente en el caso del producto presentado en el presente documento, toxicidad selectiva, recomendado por Paul Ehrlich (*donde el fármaco elimina selectivamente el patógeno referido*) (25a). Esta última característica es extremadamente útil para evitar la llamada presión de selección, desempeñada por los
65 antimicrobianos de amplio espectro, que proporciona la aparición de bacterias multirresistentes (26).

Para desarrollar este producto, los inventores seleccionaron PBP2a como objetivo, según estudios preliminares con vacuna de ADN en modelos murinos (18, 19, 21) y análisis de moléculas inmunoestructurales. La estructura de la PBP2a se dilucidó en 2002 (29) y está depositada en el PDB (Protein Data Bank) con el código 1wmr.

5 A diferencia de otros enfoques, los inventores trabajaron con una región interna de la molécula con 76 aminoácidos, que flanquean el núcleo activo de la enzima (SxxK), en el dominio transpeptidasa. Los análisis de identificación de epítomos se realizaron en la molécula y en su presentación a los diferentes alelos CHM de clase II (programa Tepitope), con verificación posterior de su ubicación en la molécula (programa SPDB-Viewer). Este enfoque nos permite evaluar la facilidad de acceso de los anticuerpos a estos objetivos en la molécula nativa.

10 Este análisis computarizado mostró la presencia de epítomos cerca del núcleo activo de la enzima, con excelente grado de reconocimiento por alelos CHM clase II, ubicados en la superficie PBP2a (datos no mostrados).

15 Estas previsualizaciones *in silico* se confirmaron mediante las pruebas de reconocimiento de objetivos realizadas (inmunotransferencia y citometría de flujo), y la unión de anticuerpos a esta región de PBP2a demostró ser capaz de conferir una alta protección, demostrado por los resultados obtenidos en las pruebas realizadas *in vitro* e *in vivo*. Los anticuerpos generados por el fragmento de 76 aminoácidos mostraron una mayor protección que los generados por la inmunización con PBP2a completa, como se ha mostrado anteriormente en los trabajos de Ohwada y Senna y confirmado mediante los resultados de los inventores.

20 La epidemiología de las infecciones causadas por MRSA muestra la presencia de los tipos clonales predominantes, responsables de brotes y epidemias en hospitales de todo el mundo. Estos clones presentan una mayor capacidad de colonización y virulencia en comparación con las cepas de MRSA no epidémicas (30).

25 Como una forma de validar los resultados obtenidos, se pretendió trabajar con diferentes clones MRSA (clones epidémicos), representantes de la mayoría de las infecciones (especialmente las hospitalarias) causadas por MRSA.

30 La cepa CEB (clon epidémico brasileño) es responsable de la mayoría de las infecciones causadas por MRSA en hospitales brasileños (31), y también se identifica en otros países de América del Sur (32, 33), Portugal y Checoslovaquia (34). El clon epidémico europeo (MRSA ibérico) se encuentra en países europeos y en Estados Unidos (35).

35 Debido al aumento en los casos de infecciones comunitarias causadas por MRSA, una de estas cepas (WB79 CA-MRSA), aislada en Brasil, se incluyó en los ensayos actuales. Estos ensayos presentan características diferenciadas de las que se encuentran en los hospitales, con mayor virulencia (presencia de leucocidina Panton-Valentine) y perfil de resistencia a antimicrobianos diferente al de las cepas de MRSA hospitalarias (36). Recientemente, en Estados Unidos se ha identificado un brote de infecciones por CA-MRSA en una población de hombres que practicaban sexo con otros hombres (37). A partir de esta fecha, se puede decir que las infecciones causadas por MRSA asumen un carácter de ETS (enfermedad de transmisión sexual).

40 Los resultados de protección conferidos por la administración del anticuerpo anti-PBP2a mostraron eficacia contra todos los diferentes clones probados, lo que nos llevó a creer en su aplicabilidad para infecciones (comunitarias u hospitalarias) causadas por cualquier tipo de MRSA.

45 Se deben comentar algunas características importantes del producto de la presente invención.

50 (i) Los resultados de la protección *in vitro* hacen creer que el mecanismo de acción involucrado, el bloqueo de una región cercana al núcleo activo de la molécula, es suficiente para inhibir el crecimiento y la multiplicación bacteriana. De manera similar a la de los antibióticos betalactámicos, este mecanismo depende del tiempo, y requiere que la bacteria esté en la fase de multiplicación exponga al objetivo a la acción del fármaco.

55 (ii) Esta característica se ve favorecida por las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos, que presentan una larga semivida en plasma (38). En comparación con la terapia con antibióticos, esto significa una administración en menor número de dosis, presentando facilidad de tratamiento para el paciente y tal vez reducir el coste final como consecuencia. Estas ideas se confirmaron en la práctica en el ensayo comparativo de protección con vancomicina (véase más abajo).

60 (iii) La inhibición del crecimiento bacteriano *in vitro* también significa que el anticuerpo no necesita los mecanismos auxiliares de respuesta antígeno-anticuerpo tradicionales, tal como la opsonización y la activación del complemento. Considerando que la mayoría de las infecciones hospitalarias ocurren en pacientes que tienen un estado de inmunodepresión, esta característica del producto es extremadamente importante.

65 (iv) Se sabe que *Staphylococcus aureus* presenta una proteína A en su superficie. Esta molécula se une característicamente a la región Fc de las inmunoglobulinas, impidiendo la actividad opsonizante del sistema inmunitario (38). Debido a los resultados obtenidos en los ensayos de los inventores, se cree que la concentración de anticuerpos administrados fue capaz de saturar la proteína A existente en la superficie bacteriana, y no previene

el bloqueo de PBP2a por los anticuerpos administrados.

Las infecciones sistémicas causadas por MRSA se han tratado con el uso de glucopéptidos, especialmente vancomicina. Sin embargo, este medicamento presenta una gama de efectos secundarios, con inmunotoxicidad (42), ototoxicidad, nefrotoxicidad y neutropenia transitoria (43) entre ellos, y requiere administración durante largos períodos, presentando un alto coste de tratamiento final.

Al usar un modelo de infección murina, fue posible comparar un tratamiento con vancomicina versus anticuerpo monoclonal y la combinación de los dos medicamentos. Los resultados obtenidos indicaron que una dosis de anticuerpo tenía una acción similar o superior a 5 dosis de vancomicina y que la administración simultánea de los dos fármacos era mucho más eficiente en la eliminación de la bacteria que la administración aislada. Estos datos son extremadamente significativos, ya que es posible pensar en un coste de tratamiento más bajo con el anticuerpo y una recuperación más eficiente de pacientes con estado grave con la administración de vancomicina y anticuerpo.

Además del uso de anticuerpos monoclonales anti-PBP2a para tratar infecciones por MRSA, la presente invención todavía considera las siguientes aplicaciones:

(i) los resultados del reconocimiento de una proteína con un peso molecular cercano al de PBP5 en la cepa de *Enterococcus* sp. cepa por el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a indica que es posible obtener una respuesta protectora contra este patógeno con la administración de anticuerpos. PBP5 presenta homología con PBP2a, siendo ambas clasificadas como PBP multimodulares de clase B, con baja afinidad por betalactámicos (40). Los enterococos son bacterias que causan infecciones hospitalarias graves, presentando un alto grado de resistencia intrínseca y adquirida a los antimicrobianos. Las cepas resistentes a la vancomicina (VRE) representan un reservorio de genes de resistencia a los glucopéptidos y pueden transferirse a otros patógenos. (41).

(ii) Estos anticuerpos pueden tener aplicabilidad para la identificación de PBP2a mediante pruebas de inmunodiagnóstico. Por ejemplo, el uso de pruebas inmunes basadas en la aglutinación de partículas de látex unidas al anticuerpo puede proporcionar un resultado que prevea la resistencia a todos los antibióticos betalactámicos en pocas horas. En las pruebas convencionales de sensibilidad a los antimicrobianos (como las pruebas de sensibilidad a antibióticos), estos resultados solo se publican después de 12 a 24 horas.

(iii) una vez que los anticuerpos monoclonales se han utilizado con éxito en aplicaciones temáticas contra las úlceras crónicas (influximab, véase la referencia Streit et al., y el documento WO 1999041285 A1), estos anticuerpos pueden administrarse tópicamente para promover la descolonización nasal por MRSA y para el tratamiento de lesiones cutáneas causado por este patógeno.

Según el conocimiento y los problemas encontrados en el estado de la técnica, los inventores actuales realizaron inmunizaciones en animales con una vacuna de ADN con construcciones correspondientes al gen *mecA* (SEQ ID NO.: 2) sin la región de fijación de membrana e inmunizaciones con una región interna de 76 aminoácidos del dominio de transpeptidasa (SED ID NO.: 3) que comprende el núcleo activo enzimático.

Las inmunizaciones se realizaron en las mismas condiciones presentadas en los trabajos de Ohwada et al. y Senna et al., que desarrollaron una vacuna de ADN contra PBP2a, utilizando la secuencia completa (excepto la región de fijación de membrana) del gen *mecA* y un fragmento interno del dominio transpeptidasa. Las inmunizaciones se realizaron con 4 dosis, y los animales inmunizados y un grupo de control no inmunizado fueron desafiados por una infección sistémica con MRSA y una determinación del número de bacterias presentes en los riñones de los animales en dos períodos distintivos. Los resultados obtenidos mostraron que la inmunización con el fragmento de transpeptidasa confirió una mayor reducción en el número de bacterias presentes en los riñones de los animales que la de los animales inmunizados con el gen *mecA*.

Así, se ve que los anticuerpos generados contra el fragmento de transpeptidasa proporcionaban una mejor protección en las condiciones utilizadas (vacuna de ADN en modelo murino) que la de los anticuerpos contra PBP2a. El fragmento de transpeptidasa incluye el núcleo activo enzimático STQK (SEQ ID NO.: 4).

Como consecuencia, según los resultados encontrados, los inventores dirigieron la invención para producir anticuerpos monoclonales capaces de reconocer y unirse a la proteína PBP2a y otras proteínas que presentan secuencias homólogas a la proteína PBP2a y usar el fragmento de transpeptidasa que incluye el núcleo activo de la enzima.

La invención se describirá a continuación con referencia a los ejemplos, que no deben considerarse limitantes.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS:

1. Bacterias:

Se utilizaron las siguientes cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina: MRSA Ibérica, COL-MRSA

(cedido por *Unité des Agents Antimicrobiens - Institut Pasteur* [Unidad de Antimicrobial Agents - Pasteur Institute], Dr. Patrice Courvalin), WB79 CA-MRSA, and CEB-MRSA (cedida por el Dr. Agnes Figueiredo, *Instituto de Microbiologia* [Microbiology Institute] of UFRJ); una cepa de *Enterococcus faecalis* resistente a la vancomicina; y una cepa de *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (MSSA). Las cepas de *Escherichia coli* BL21 DE3 (Novagen) y TOP10 (Invitrogen) también se usaron como control.

2. Animales:

Ratones hembra Balb/C, de 4 a 8 semanas de edad, obtenidos de CECAL-FIOCRUZ y alojados en LAEAN-BioManguinhos se usaron en los ensayos de inmunización y protección *in vivo*.

3. Inmunización:

Los ratones (4 animales) recibieron una dosis inicial de 100 microgramos de plásmido pCI-Neo: fragmento del gen *mecA* de MRSA (18), seguido de una dosis de 10 microgramos de proteína recombinante purificada 14 días después, correspondiente a una región interna de PBP2a de MRSA (21), emulsionada en adyuvante completo de Freund, seguido de otra dosis 14 días después, emulsionado en adyuvante incompleto de Freund. Catorce días después, el animal con la mejor respuesta inmunitaria (evaluada por inmunoensayo enzimático - ELISA) recibió una dosis intravenosa de 10 microgramos de proteína purificada diluida en PBS (solución salina tamponada con fosfato). Tres días después de la inyección IV, el animal fue sometido a eutanasia por asfixia en CO₂ (**Protocolo CEUA L0009-07 - FIOCRUZ**), y el bazo se extrajo asépticamente para la fusión celular. El suero del animal con la mejor respuesta inmunitaria se usó como control positivo para otras pruebas inmunológicas.

4. Producción de anticuerpos monoclonales:

Los linfocitos extraídos del bazo se sometieron a fusión con células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC 1581), utilizando polietilenglicol para la fusión, y se cultivaron en medio de hipoxantina-aminopterina-timidina a 37 °C en una atmósfera de 10 % de CO₂, según el protocolo para producir anticuerpos monoclonales en *Current Protocols in Immunology* (22). Los hibridomas resultantes se evaluaron mediante la prueba ELISA después de 14 días, utilizando la proteína recombinante purificada como antígeno, de acuerdo con lo que se describe a continuación. Los mejores hibridomas fueron sometidos a clonación, con selección de los mejores clones por ELISA y estos últimos almacenados en nitrógeno líquido.

5. Enzimoimmunoensayo- ELISA:

Las placas de plástico de 96 pocillos Maxisorb se sensibilizaron con 500 nanogramos/pocillo de proteína recombinante (fragmento PBP2a) en tampón de carbonato/bicarbonato y se incubaron a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces con PBS que contenía 0,05% de Tween 20 y se bloquearon en PBS y leche desnatada al 5 % durante dos horas a 37 °C. Se utilizaron las muestras a analizar (suero de animales inmunizados diluidos a 1:100 o sobrenadantes de cultivo celular) e incubados durante 2 horas a 37 °C. La placa se lavó tres veces con PBS y Tween 20 (0,05 %) nuevamente, y el conjugado anti-Ig (anti-ratón HRP Ig SIGMA A 0412) se añadió a una dilución 1:5.000, seguido de incubación a 37 °C durante 90 minutos. Después de este período, la placa se lavó tres veces con PBS y Tween 20 (0,05 %), con adición de revelador de color de TMB peroxidasa (BioRad) e incubación durante 15 minutos protegido de la luz. La reacción se interrumpió mediante la adición de H₂SO₄ 0,5 N y la lectura se realizó a 450 nm. Se usó un suero policlonal hiperinmune diluido a 1:200 como control positivo.

5.1. Ensayos de avidéz basados en enzimoimmunoensayo

5.1.1. Ensayo de avidéz con urea (Niederhouser *et al.* - 5.1):

El protocolo es similar al inmunoensayo uno (5), con las siguientes modificaciones: después de la incubación de la muestra (100 ng de clon 10 anticuerpo monoclonal purificado y 2,0 ng de clon 38 de anticuerpo monoclonal purificado) durante dos horas a 37 °C, las muestras se sometieron a tres lavados con urea 8 M en PBS y Tween 20 (0,05 %), seguido de cuatro lavados en PBS y Tween 20 (0,05 %), presentando la misma muestra procesada normalmente (sin tratamiento con urea) como control. Después de leer las densidades ópticas de la muestra, la tasa de avidéz se calculó por la relación de la lectura con urea dividida por la lectura sin urea, multiplicado por 100 (resultado de percentil).

5.1.2. Ensayo de avidéz con tiocianato de amonio (Goldblat *et al.* - 5.2)

El protocolo es similar al inmunoensayo uno (5), con las siguientes modificaciones: después de la incubación de la muestra (100 ng de clon 10 anticuerpo monoclonal purificado y 2,0 ng de clon 38 de anticuerpo monoclonal purificado) durante dos horas a 37 °C, las muestras se sometieron a tratamiento con tiocianato de amonio durante 30 minutos a 37 °C en las siguientes concentraciones: 3 M; 1,5 M; 1,0 M; 0,75 M; 0,50 M; 0,25 M; y 0,125 M. Se usó una muestra no tratada con tiocianato de amonio como control para cada clon.

Después de leer las densidades ópticas de la muestra, la tasa de avidez se calculó mediante la siguiente fórmula:
AR (tasa de avidez) = $[(\log 50 - \log A) \times (B - A) / \log B - \log A] + A$; donde $\log 50 = 1,70$. **A** es la concentración más baja de tiocianato de amonio que resulta en una reducción de la absorbancia inferior al 50 %, y **B** es la concentración más alta de tiocianato de amonio que resulta en una reducción de la absorbancia superior al 50 %.

6. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales:

Se cultivó una muestra de los clones 10 y 38 previamente seleccionados en un medio sin suero (GIBCO VP-SFM) con la adición de BSA al 1 % en viales de 100 ml en una estufa con atmósfera de CO₂ al 10 %. Los sobrenadantes fueron sometidos a centrifugación, seguido de filtración en filtros de 0,22 micrómetros y purificado en cromatografía de alta resolución (HPLC) con resina SelectSure protein A MAB (GE). Los anticuerpos se neutralizaron a pH 7,0 con Tris 1 M, pH 10,0, se dializaron contra PBS 0,5x en agua desionizada. Las muestras fueron sometidas a un proceso de liofilización, se resuspendieron en agua desionizada, se cuantificaron por el método de Lowry y se evaluaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

7. Reconocimiento de objetivos:

7.1. Reconocimiento de PBP2a *in vitro* - inmunotransferencia:

Una cepa de MRSA (CEB), una cepa de *Staphylococcus aureus* sensible a la metilicina (MSSA), una cepa de *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina y la cepa de *Escherichia coli* BL-21 DE3 se cultivaron en fase exponencial. Se centrifugó un ml de cada muestra y se lisó mediante agitación en perlas de vidrio en un dispositivo mini Bead Beater (Biospect Products), 3 veces durante 30 segundos. Una parte alícuota de cada muestra se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante al 12 % (SDS-PAGE), y las proteínas se transfirieron posteriormente a una membrana de nylon (Hybond N-BioRad). La membrana se bloqueó con agitación suave durante dos horas en tampón PBS que contenía leche desnatada al 10 % y BSA al 1 % (seroalbúmina bovina). La membrana se lavó tres veces en PBS y Tween 20 (0,05 %) y tres veces en PBS. Después, esta última se introdujo en incubación durante dos horas, con sobrenadante de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a diluido en PBS en proporción 1:1. Tras la incubación, la membrana se lavó como se ha descrito previamente, y el conjugado de fosfatasa alcalina (anticuerpo anti-IgG murino - Sigma A3688) a una proporción de 1:15.000 y se incubó durante noventa minutos. Después de este período, el lavado en PBS se realizó nuevamente y se realizó el desarrollo con sustrato Western Blue para fosfatasa alcalina (Promega).

7.2. Reconocimiento de PBP2a en la superficie de la bacteria - citometría de flujo:

Se cultivó una cepa de MRSA (CEB) en fase estacionaria (ON) o exponencial. Las muestras se lavaron en PBS 1x y se resuspendieron a una DO₆₀₀ de 0,6 (~10⁸ bacterias/ml). Estos últimos se centrifugaron en 1 ml (10⁸ bacterias) y se resuspendieron en BSA al 0,5 % y una dilución 1:10 de suero normal (murino/humano). Después, las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4 °C y, a continuación, los concentrados (pellas) se lavaron 2 veces en PBS y se volvieron a suspender en 100 microlitros de PBS que contenían BSA al 0,5 % y una dilución 1: 10.000 de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Después de esta etapa, las muestras se lavaron como anteriormente nuevamente y se resuspendieron en 100 microlitros de PBS y BSA al 0,5 % y una dilución (1:1000) de conjugado anti-Ig de ratón con PE (ficoeritrina), incubándose después en la oscuridad durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, las muestras se lavaron nuevamente y se fijaron durante 15 minutos a 4 °C en PBS que contenía paraformaldehído al 2 %. Después de esta preparación, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo (Becton y Dickinson - FACScalibur).

8. Ensayos de protección *in vitro*: determinación de la concentración mínima inhibitoria:

Las cepas de MRSA (CEB, Ibérica, COL y CA) se cultivaron en fase exponencial hasta 600 nm de densidad óptica igual a 0,5. El inóculo aplicado se ajustó para que contuviera aproximadamente 100.000 bacterias. Se añadieron caldo de Müller Hinton, inóculo bacteriano y cantidades crecientes de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a purificado a tubos de ensayo o placas de 24 cavidades. Las placas o tubos se sometieron a incubación a 37 °C durante 12 horas. Después de este período, se observó presencia o ausencia de turbidez en las muestras. La concentración mínima inhibitoria se consideró como la menor cantidad de anticuerpo capaz de inhibir el crecimiento del inóculo bacteriano (100.000 bacterias).

9. Ensayos de protección *in vivo*:

9.1. Determinación de la dosis letal y la DL₅₀ para cepas de MRSA.

La determinación de la dosis letal y la DL₅₀ se realizaron de acuerdo con el método Reed-Muench (23) para las cepas de MRSA (CEB, Ibérica, WB79 CA y COL). Se inoculó a grupos de ratones Balb/C hembra de 8 semanas por vía intraperitoneal dosis crecientes de bacterias y se observaron durante 7 días. Se sacrificó a los animales que sobrevivieron después de este período, de acuerdo con las normas de bienestar animal establecidas.

9.2. Infección sistémica y ensayos de cuantificación renal bacteriana.

5 Las cepas de MRSA (CEB, ibérica y WB79 CA) se cultivaron en fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,6$), se lavaron y se resuspendieron en PBS estéril 1x a $DO_{600} \sim 0,5$, correspondiente a aproximadamente 2×10^8 bacterias. Esta concentración se calculó por dilución y siembra en placas de agar BHI que contenían 10 microgramos de oxacilina/ml. Los ratones Balb/C hembra de 8 semanas recibieron una dosis intraperitoneal de 400 microgramos de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a purificado en el primer día. Al sexto día, se sacrificó a los animales y se extirparon los riñones asépticamente. Después, los riñones se homogeneizaron en 1 ml de caldo estéril de Luria y se diluyeron sucesivamente en series de 10. Se sembraron cien microlitros de cada dilución en placas de agar BHI que contenían 10 microgramos/ml de oxacilina y se incubaron durante 24 horas a 37°C , realizándose un recuento de colonias resultantes y cálculos de diluciones totales.

9.3. Ensayo de supervivencia.

15 Las cepas de MRSA se cultivaron en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero se realizó un ajuste de inóculo para la DL_{50} previamente establecida. Los ratones Balb/C hembra de 8 semanas recibieron una dosis intraperitoneal de 500 microgramos de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a purificado en el primer día. Al día siguiente, se infectó estos animales más un grupo de control con una dosis de aproximadamente $2,5$ a $6,0 \times 10^8$ bacterias por vía intraperitoneal, conforme a la DL_{50} de cada cepa. Los animales fueron observados durante 10 días, sacrificando a los supervivientes.

10. Estudio comparativo de protección *in vivo* de anticuerpos monoclonales anti-PBP2a y vancomicina - cuantificación renal:

25 **Ensayo I**

30 Cuatro grupos de ratones Balb/C hembra de 8 semanas (4 animales por grupo) recibieron una dosis infecciosa de $6,0 \times 10^7$ bacterias (CEB-MRSA) por vía intraperitoneal. Los animales recibieron dosis de anticuerpo monoclonal purificado (MAB), vancomicina, MAB + vancomicina, y control negativo, de acuerdo con los siguientes grupos:
 grupo 1: MAB (400 microgramos) (primer día)
 grupo 2: vancomicina (150 microgramos, vía intramuscular, 12/12 horas)
 grupo 3: vancomicina + MAB (350 microgramos) (1 día después de la infección)
 grupo 4: control

35 Las primeras dosis de anticuerpo y vancomicina se administraron 4 horas después de la administración de la dosis infecciosa. Se sacrificó a los animales al cuarto día, y los riñones fueron extirpados asépticamente y sometidos a calificación renal, de acuerdo a lo descrito anteriormente.

40 **Ensayo II**

45 Este ensayo se realizó de la misma manera que el anterior, pero, con una dosis infecciosa más baja ($7,0 \times 10^6$ bacterias), con el grupo 1 siendo tratado con 500 microgramos de anticuerpo monoclonal purificado; tratándose el grupo 2 con vancomicina (150 microgramos, vía intramuscular, 12/12 horas; 5 dosis); tratándose el grupo 3 con vancomicina + 500 microgramos de anticuerpo monoclonal; y siendo el grupo 4 el control (animales no tratados).

11. Identificación de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal anti-PBP2a

50 **11.1 Extracción de ARNm de células de hibridoma**

Se procesó un centrifugado (precipitado) de 10 ml de un cultivo celular de hibridoma productor de anticuerpos monoclonales para la extracción de ARNm usando el kit RNeasy Minikit (Qiagen).

55 **11.2 Obtención de ADNc**

Reacción con transcriptasa inversa: Se usó el kit de transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen) para obtener ADN complementario, siguiendo las pautas de fabricación.

60 **11.3. Amplificación de cadenas VH y VL por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Las reacciones se realizaron utilizando las secuencias de inicio (cebadores) a continuación.

SEQ ID NO.	Secuencia	Uso
	PARA CADENA PESADA	
18	5' ATG(GA)A(GC)TT(GC)TG(GC)T(ACT)T(AC)A(AG)CT(GT)G(GA)TT 3'	Amplificación de la VH
19	5' ATG(GA)AATG(GC)A(GC)CTGGT(CT)(AA)T(CT)CTCT 3'	Amplificación de la VH
20	5' GATGTGAAGCTTCAGGAGTC 3'	Amplificación de la VH
21	5' CAGGTGCAGCTGAAGGAGTC 3'	Amplificación de la VH
22	5' CAGGTGCAGCTGAAGCAGTC 3'	Amplificación de la VH
23	5' CAGGTTACTCTGAAAGAGTC 3'	Amplificación de la VH
24	5' GAGGTCCAGCTGCAACAATCT 3'	Amplificación de la VH
25	5' GAGGTCCAGCTGCAGCAGTC 3'	Amplificación de la VH
26	5' CAGGTCCAACTGCAGCAGCCT 3'	Amplificación de la VH
27	5' GAGGTGAAGCTGGTGAGTC 3'	Amplificación de la VH
28	5' GATGTGAACTTGGAAAGTGC 3'	Amplificación de la VH
29 (gamma 1)	5' TGGACAGGGATCCAGAGTCCAGGTCAGT 3'	Amplificación de la VH
	PARA LA CADENA LIGERA	
30	5' GACATTGTGATGACCCAGTCT 3'	Amplificación de la VL
31	5' GATGTTTTGATGACCCAAACT 3'	Amplificación de la VL
32	5' GATAATTGTGATAACCCAG 3'	Amplificación de la VL
33	5' GACATTGTGCTGACCCAAATCT 3'	Amplificación de la VL
34	5' GATATTGTGCTAACTCAGTCT 3'	Amplificación de la VL
35	5' GATATCCAGATGACACAGACT 3'	Amplificación de la VL
36	5' GACATCCAGCTGACTCAGTCT 3'	Amplificación de la VL
37	5' CAAATTGTTCTACCCAGTCT 3'	Amplificación de la VL
38	5' CAGGCTGTTGTGACTCAGGAA 3'	Amplificación de la VL
39 (kappa 18)	5' TACAGTTGGTGCAGCATC 3'	Amplificación de la VL

11.4. Secuenciación de cadenas ligeras y pesadas de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a

Etapas de secuenciación:

5 **I. Amplificación**

Esto se realizó utilizando las secuencias iniciales anteriores, definidas por la SEQ ID NO.: 18 a SEQ ID NO.: 39.

10 **II. Secuenciación**

Se usó el dispositivo ABI Prism 3100, Genetic Analyser (Hitachi).

11.5. Análisis de secuencia e identificación de CDR de cadena ligera y pesada

15 Las secuencias de ADN obtenidas se analizaron con la ayuda del programa DNA Star, y se tradujeron a secuencias de aminoácidos (sitio ExpASy - Programa de traducción) para su posterior análisis por los algoritmos de Kabat (24) y Chotia (25) para la identificación de CDR de cadena ligera y pesada.

20 **12. Determinación de las constantes de asociación y disociación para anticuerpos monoclonales (clones 10 y 38 mediante el método de resonancia de plasmón superficial [SPR] [Biacore])**

Las mediciones de SPR se realizaron utilizando un sensor CM-5 en un dispositivo Biacore X® (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Los reactivos de unión y tampones HBS-EP (hepes 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005 % P20 [Tween 0, pH 7,4]) se adquirieron a GE Healthcare.

25

Ejemplo 2

1. Obtención de anticuerpos monoclonales anti-PBP2a murinos:

30 Un grupo de animales se sometió al protocolo de inmunización de acuerdo con lo descrito anteriormente. El resultado evaluado por la prueba ELISA se describe en la Figura 1.

Después del proceso de fusión (fusión del número 90-LATAM), el sobrenadante de 96 cavidades (hibridomas) se analizó mediante la prueba ELISA. De este total, se seleccionaron las cinco mejores muestras y se expandieron las células (clonación). Después, de nuevo, las muestras positivas se analizaron mediante ELISA. Las muestras positivas se validaron mediante inmunotransferencia contra la proteína recombinante purificada (PBP2a) para validar los resultados obtenidos con el ELISA. El resultado final está en la Tabla I.

35

La Figura 1 revela el resultado de la prueba de inmunoenzima (ELISA) de los sueros de los animales inmunizados para producir anticuerpos anti-PBP2a. Cada roce corresponde al suero diluido 1:100 de los animales inmunizados. El suero de control positivo está en marca angular [□□]. Primera barra de cada marca: suero preinmune; segunda barra: suero después de la cuarta inmunización; y tercera barra: suero después de la quinta inmunización.

40

Tabla I. Clonaciones de fusión 90: balance final

45

Hibridomas clonados	Número total de clones	Clones Positivos (ELISA)	Clones positivos (inmunotransferencia)	Clones seleccionados
77	70	2	1 (clon 38)	1
68	108	10	1 (clon 10)	1
79	91	Cero	-	-
17	101	Cero	-	-
70	48	2	Cero	-
	418	14	2	2

50

De los clones seleccionados, el clon 77-38 se sometió a un proceso de reclonación para verificar la estabilidad celular para secretar anticuerpos monoclonales. De las 50 cavidades analizadas, todas presentaron resultados positivos por prueba ELISA. Estos clones se expandieron y se almacenan en nitrógeno líquido en las instalaciones de LATAM (Laboratorio de tecnología de anticuerpos monoclonales).

2. Crecimiento, producción y purificación de anticuerpos monoclonales:

El proceso se estandarizó de acuerdo con lo descrito anteriormente. La producción obtenida es de aproximadamente 4 miligramos de anticuerpo monoclonal por cada 100 ml de sobrenadante sometido al proceso de purificación. Los resultados obtenidos se pueden ver a continuación.

55

En la Figura 2, se puede ver un gel de poliacrilamida con muestras crudas y después de la purificación. Esta Figura 2 muestra el gel de poliacrilamida no desnaturizante con muestras de sobrenadante antes (columna 1) y después de la purificación (2) en columna de HPLC con resina MAb SelectSure. Las columnas 3 a 9 corresponden a las fracciones de muestra purificadas obtenidas. La flecha indica el tamaño aproximado de 150 kDa.

5

3. Caracterización funcional de anticuerpos monoclonales:

3.1. Reconocimiento de PBP2a *in vitro* - inmunotransferencia

10 Para investigar la capacidad de reconocimiento de anticuerpos por el objetivo en el patógeno (PBP2a y secuencias similares), la prueba de inmunotransferencia se realizó con bacterias que presentan PBP2a (CEB y COL MRSA), una cepa MSSA (*Staphylococcus aureus* sensible a meticilina) (que no presenta PBP2a), una cepa de *Enterococcus* sp resistente a la vancomicina (que presenta PBP5), una transpeptidasa con baja afinidad por los antibióticos betalactámicos (homólogos a PBP2a) y una cepa de *Escherichia coli* (donde se generó la proteína recombinante) como control negativo. Los resultados obtenidos muestran que el anticuerpo pudo reconocer una proteína con un peso molecular de aproximadamente 76 kDa en MRSA y cepas de *Enterococcus* sp., correspondiente al tamaño de PBP2a y PBP5, respectivamente. No se observó reactividad del anticuerpo monoclonal con proteínas de *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (PBP2a negativo) ni con la cepa de *Escherichia coli*. Los resultados se pueden ver en la Figura 3 (inmunotransferencia contra MRSA y MSSA).

15

20 El resultado de la prueba de inmunotransferencia de lisados de MRSA y MSSA contra el sobrenadante que contiene anticuerpos monoclonales anti-PBP2a se muestra en la Figura 3.

25

1. - Marcador de peso molecular (caleidoscopio);
2. - Muestra de MSSA cultivada en fase exponencial;
- 3 y 4. - Muestra de MRSA cultivada en fase exponencial;
5. - Muestra de MSSA cultivada en fase estacionaria (durante la noche); y
- 6 y 7. - Muestras de MRSA cultivadas en fase estacionaria. La flecha izquierda indica el peso molecular de PBP2a.

30

3.2. Reconocimiento de PBP2a en la superficie de la bacteria - citometría de flujo

El objetivo de la prueba de citometría de flujo es validar la capacidad de reconocimiento de objetivos en la bacteria en su forma nativa por el anticuerpo monoclonal. En pruebas anteriores (inmunotransferencia), se observó el reconocimiento del objetivo en proteínas sometidas a un proceso de desnaturalización, que se produce durante la separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante. De nuevo, se analizó una cepa de control negativo (MSSA, PBP2a-negativa) y una cepa MRSA (CEB) desarrollada en fases exponenciales y estacionarias. Los resultados obtenidos muestran que el anticuerpo es capaz de reconocer el objetivo en la superficie bacteriana en ambas condiciones. La presencia de proteína A en la superficie de *Staphylococcus* no fue capaz de inhibir la unión del anticuerpo con PBP2a. Los resultados obtenidos se pueden ver en la Figura 4.

35

40 La Figura 4 muestra los resultados de la citometría de flujo de bacterias MRSA (CEB) y MSSA incubadas con anticuerpo monoclonal anti-PBP2a y marcadas con ficoeritrina (PE). En (1), bacterias MSSA; en (2), MRSA cultivado en fase estacionaria; en 3, MRSA cultivado en fase exponencial. Las poblaciones de MRSA presentan un desplazamiento a la derecha, correspondiente a un incremento en las células marcadas por el conjugado fluorescente.

45

4. Evaluación de la protección conferida por el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a:

4.1. Pruebas de protección *in vitro*

50

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Estos ensayos tienen como objetivo evaluar la capacidad del anticuerpo para unirse directamente al objetivo en un sistema cerrado. Para anticuerpos monoclonales con finalidad terapéutica, los resultados positivos tienen una importancia extrema, ya que significan que el anticuerpo puede reconocer el objetivo y bloquear el crecimiento bacteriano sin la ayuda del sistema inmunitario del huésped, tal como la activación del complemento y los mecanismos de opsonización, resultante de la acción combinada con el sistema inmunitario innato y adaptativo del huésped. Las cepas CEB, COL y MRSA ibérica se evaluaron, donde se observaron valores de CMI similares (aproximadamente 500 microgramos) en las condiciones evaluadas. Estos datos indican que, independientemente del origen genético de las diferentes cepas de MRSA, las dosis de anticuerpos necesarias para bloquear el crecimiento no son las mismas. Estos resultados se pueden ver en la Figura 5.

55

60

La Figura 5 muestra la prueba de la protección *in vitro* (CMI - concentración mínima inhibitoria) conferida por el anticuerpo monoclonal purificado anti-PBP2a y la vancomicina contra un inóculo de 10^5 células de diferentes cepas de MRSA. La ausencia de turbidez indica que no hubo crecimiento bacteriano en las condiciones analizadas.

65

- 1A:** CEB MRSA (clon epidémico brasileño + 250 µg de anticuerpo;
2A: CEB MRSA + 500 µg de anticuerpo;
3 A: CEB MRSA + 750 µg de anticuerpo;
4A y 6A: controles negativos de la cepa CEB MRSA.
 5 **1B:** COL MRSA + 250 µg de anticuerpo;
2B: COL MRSA + 500 µg de anticuerpo;
3B: COL MRSA + 750 µg de anticuerpo;
4B y 6B: controles negativos de la cepa COL MRSA.
 10 **1C:** MRSA ibérico (clon epidémico europeo - CEE) + 250 µg de anticuerpo;
2C: EEC MRSA + 500 µg de anticuerpo;
3C: EEC MRSA + 750 µg de anticuerpo;
4C y 6C: controles negativos de la cepa EEC MRSA.
1D: CEB MRSA + 150 µg de vancomicina;
2D: CEB MRSA + 300 µg de vancomicina;
 15 **3D:** CEB MRSA + 500 µg de vancomicina;
4D: CEB MRSA + 750 µg de vancomicina;
5D y 6D: controles negativos.

4.2. Pruebas de protección *in vivo*

4.2.1. Determinación de dosis letales y subletales para las cepas CEB, Ibérica, WB79 CA y COL MRSA:

Estos ensayos fueron necesarios para evaluar la protección *in vivo* en los dos modelos utilizados: la cuantificación renal por dosis subletal y la prueba de supervivencia después de una infección sistémica con un inóculo de bacterias más grande, capaz de causar la muerte en aproximadamente el 50 % de los casos animales (DL₅₀). La ruta elegida fue intraperitoneal, debido a la facilidad de administración y la ausencia de pérdidas. Se utilizó una adaptación del método Reed-Muench para realizar el ensayo, con dos animales por condición (dosis bacteriana infecciosa en concentraciones crecientes) para determinar las dosis DL₅₀ y subletal, y se probaron tres dosis diferentes, una vez que tuvimos conocimiento previo sobre las dosis letales medias para *Staphylococcus aureus*. La cepa MR MRSA, el primer clon de MRSA en secuenciar su genoma, se utiliza como cepa de referencia para estudios sobre este patógeno. Sin embargo, se mostró poco virulento, y necesitaba altas dosis infecciosas en relación con los otros clones de MRSA para causar infección en animales. Por lo tanto, no se usó en ensayos de protección.

4.2.2. Ensayos de protección renal después de infección sistémica con dosis subletal

Usando un modelo de cuantificación renal después de la infección, Estos ensayos permiten evaluar la capacidad de los anticuerpos para reducir la presencia de bacterias en los órganos vitales (riñones) después de una infección sistémica. Se alcanzó una reducción superior a 3 log (1.000 veces) en tres ensayos independientes con cepas de MRSA virulentas de diferentes antecedentes genéticos. En estos ensayos, los animales recibieron una dosis previa de 500 microgramos de anticuerpo. La protección conferida por una dosis de anticuerpo más baja (250 microgramos) se evaluó en el ensayo con la cepa CA-MRSA, donde también se observó una reducción bacteriana, pero inferior a la obtenida con la dosis de 500 microgramos. Los resultados se pueden ver en las Figuras 6A, 6B y 6C.

La Figura 6A muestra los resultados de la cuantificación renal en animales tratados y no tratados con anticuerpo monoclonal anti-PBP2a y sometidos a infección sistémica con una dosis subletal de cepa MRSA CEB. En rayas horizontales: log de la concentración de bacterias aisladas de los riñones de cada animal no tratado. En patrón a cuadros: log de la cantidad de bacterias aisladas de los riñones de cada animal tratado con el anticuerpo. Cuantificación bacteriana: controles: C1: 2.000 bacterias; C2: 29.000 bacterias; C3: 220.000 bacterias; C4: 52.000 bacterias (media de 75.750 bacterias). Animales tratados (protegidos): P1: 20 bacterias; P2, P3 y P4: 10 bacterias (media de 12,5 bacterias). Reducción en la cantidad de bacterias recuperadas de los animales tratados en relación con los no tratados: 6.060 veces.

La Figura 6B muestra los resultados de la cuantificación renal en animales tratados y no tratados con anticuerpo monoclonal anti-PBP2a y sometidos a infección sistémica con una dosis subletal de la cepa MRSA ibérica (clon epidémico europeo). En rayas horizontales: log de la concentración de bacterias aisladas de los riñones de cada animal no tratado. En patrón de cuadros grandes: log de la cantidad de bacterias aisladas de los riñones de cada animal tratado con el anticuerpo. Las barras en el patrón de cuadros pequeños indican los medios obtenidos respectivos. Cuantificación bacteriana: controles: C1: 210.000 bacterias; C2: 44.000 bacterias; C3: 300.000 bacterias; C4: 290.000 bacterias (media de 211.000 bacterias). Animales tratados (protegidos): P1: 80 bacterias; P2: 200 bacterias; P3: 10 bacterias; y P4: 60 bacterias (media de 87,5 bacterias). **Reducción en la cantidad de bacterias recuperadas de animales tratados en relación con los no tratados: 2420 veces.**

La Figura 6C muestra los resultados de la cuantificación renal en animales tratados y no tratados con anticuerpo monoclonal anti-PBP2a y sometidos a infección sistémica con una dosis subletal de la cepa WB79 CA-MRSA (cepa comunitaria brasileña). Cinco primeras barras (en xx, trazos horizontales y patrón de cuadros grandes): log de la

concentración de bacterias aisladas de los riñones de cada animal no tratado. Primera barra (en xx): estimación en relación con un animal muerto antes de la eutanasia. Barras 6, 7, 8 y 9 (en trazos horizontales y patrón de cuadros): log de la cantidad de bacterias aisladas de los riñones de animales tratados con 250 µg de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a. Barras 10, 11, 12 y 13 (en triángulos): log de la cantidad de bacterias aisladas de los riñones de cada animal tratado con 500 µg de anticuerpo. Barras con cuadros (las barras 5ª, 9ª y 13ª) indican los medios respectivos obtenidos. Cuantificación bacteriana: controles: C1: 650.000 bacterias; C2: 26.000 bacterias; C3: 17.000 bacterias; C4: 500.000 bacterias (*estimación de animales muertos*) (media de 231.000 bacterias). Animales tratados con 250 µg de anticuerpo: P1: cero; P2: 5.400 bacterias; P3: 830 bacterias; y P4: 10 bacterias (media de 1.560 bacterias). Animales tratados con 500 µg de anticuerpo: P1: 80; P2: cero; P3: 210; P4: 80 bacterias (media de 92,5),
Reducción en la cantidad de bacterias recuperadas de animales tratados en relación con los no tratados con 250 µg de anticuerpo: 149 veces. Con 500 µg: 2.497 veces.

4.2.3. Ensayo de supervivencia

En este tipo de ensayo, los inventores evaluaron la protección conferida por el anticuerpo a los animales después de una infección con una carga bacteriana capaz de matar al 50 % de los animales (DL₅₀) o más. Se evaluó la protección contra las tres cepas utilizadas en el ensayo de cuantificación renal. Se observó una reducción significativa en (i) el tiempo de supervivencia y (ii) la supervivencia misma de los animales bajo tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-MRSA en los tres ensayos independientes.

En el ensayo con LA cepa MRSA CEB, el 70 % de los animales bajo tratamiento sobrevivieron a la infección, frente a solo el 10 % del grupo control (no tratado). En el ensayo con la cepa MRSA ibérica, los resultados obtenidos fueron similares, con un 60 % de protección en animales bajo tratamiento y un 100 % de muerte en el grupo control. En el ensayo con la cepa CA MRSA, se vio una protección del 100 %, en comparación con el 70 % en los animales de control. Estos resultados se pueden ver en las Figuras 7a, 7b y 7c.

La Figura 7A muestra la curva de supervivencia de los animales tratados (protegidos) y no tratados (control) después de la infección mediante una dosis de $2,3 \times 10^8$ bacterias (CEB MRSA) administrada por vía intraperitoneal (DL₅₀).

La Figura 7B muestra la curva de supervivencia de animales tratados (protegidos) y no tratados (control) después de la infección mediante una dosis de $4,2 \times 10^8$ bacterias (MRSA ibérico) administradas por vía intraperitoneal (~ DL₅₀).

La Figura 7C muestra la curva de supervivencia de los animales tratados (protegidos) y no tratados (control) después de la infección mediante una dosis de $1,1 \times 10^9$ bacterias (WB79 CA-MRSA) administrada por vía intraperitoneal (~ DL₅₀).

4.2.4. Estudio comparativo sobre la protección conferida por anticuerpos monoclonales frente a vancomicina

Como la vancomicina es un antimicrobiano de primera elección para el tratamiento de infecciones graves por MRSA, se realizó un estudio comparativo sobre protección en un modelo diferente a los anteriores. En el presente estudio, se infectó a los animales y la administración de los anticuerpos antimicrobianos o monoclonales se inició justo después de cuatro horas de infección. El estudio se realizó con tres grupos distintos: uno tratado con vancomicina, otro tratado con anticuerpos monoclonales y un tercero con administración simultánea de anticuerpos + antimicrobianos. Las dosis de vancomicina se ajustaron y administraron de manera similar a los casos de infecciones en seres humanos (500 mg cada 12 horas).

Los resultados obtenidos indicaron que hubo una reducción de aproximadamente 15 veces en la cantidad de bacterias presentes en los riñones de los animales tratados con antimicrobianos o anticuerpos tres días después de la infección. Sin embargo, se observó una reducción de 4.617 veces en el grupo que recibió tratamiento con antimicrobianos y anticuerpos.

Basándose en estos resultados, se puede concluir que la protección conferida por una dosis de anticuerpo correspondía a cinco dosis de vancomicina y que la administración simultánea de vancomicina y anticuerpos fue muy eficiente para reducir la carga bacteriana observada en los riñones de animales infectados. Este estudio se repitió con una dosis infecciosa un poco más baja para poder observar mejor la acción protectora de los anticuerpos monoclonales anti-MRSA, tanto aislados como en asociación con vancomicina (véanse las figuras 8).

Después de la realización del segundo ensayo con una dosis infecciosa más baja, los resultados obtenidos confirmaron los resultados iniciales. La protección conferida por el tratamiento con anticuerpo monoclonal causó una reducción de 89 veces, que fue mayor que la protección obtenida con el tratamiento con 5 dosis de vancomicina (reducción de 35 veces). Sin embargo, el resultado de reducción más significativo se observó en el grupo tratado con anticuerpo + vancomicina, causando una reducción de 450 veces.

La Figura 8A muestra la cuantificación bacteriana en riñones de animales tratados con anticuerpo monoclonal anti-PBP2a, vancomicina y asociación de anticuerpo + vancomicina y en animales no tratados después de la infección

con $6,0 \times 10^7$ bacterias (CEB MRSA). El inicio del tratamiento ocurrió 4 horas después de la infección. La vancomicina se administró cada 12 horas (5 dosis). Barras 1, 2, 3, 4 y 5 (trazos): log de la concentración de bacterias recuperadas de animales no tratados (controles). C1: 7.000.000; C2: 295.000; C3: 380.000; C4: 3.200.000 (media: 2.718.750 bacterias). Barras 6, 7, 8, 9 y 10 (patrón de cuadros): log de la concentración de bacterias recuperadas de animales tratados con 400 μg de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a. P1: 4.200; P2: 310.000; P3: 330.000; P4: 90.000 (media de 183.550 bacterias). Barras 11, 12, 13, 14 y 15 (esferas): animales tratados con vancomicina. P1: 110.000; P2: 58.000; P3: 500.000; P4: 21.000 (media de 172.250 bacterias). Barras 16, 17, 18, 19 y 290 (triángulos): log de la concentración de bacterias recuperadas de animales tratados con anticuerpo (300 μg) + vancomicina. P1: 1.100; P2: 700; P3: 450; P4: 90 (media de 585 bacterias).

La Figura 8B muestra la cuantificación bacteriana en riñones de animales tratados con anticuerpo monoclonal anti-PBP2a (barras 7 a 12), vancomicina (barras 13 a 18), asociación anticuerpo + vancomicina (19 a 24) y de animales no tratados (barras 1 a 6) después de la infección con $7,0 \times 10^6$ bacterias (CEB MRSA). El tratamiento comienza en 4 horas después de la infección. Vancomicina administrada cada 12 horas (5 dosis). Barras 1 a 6: log de la concentración de bacterias recuperadas de animales no tratados (controles). C1: 6.000; C2: 1.000; C3: 500; C4: 118.000; y C5: 1.000 (media: 25.220 bacterias). Barras 7 a 12: log de la concentración de bacterias recuperadas de animales tratados con 500 μg de anticuerpo monoclonal anti-PBP2a. MB1: 450; MB2: 200; MB3: 100; MB4: 20; MB5: cero (media de 284 bacterias). Barras 13 a 18: animales tratados con vancomicina. VC1: 100; VC2: 700; VC3: cero; VC4: cero; VC5: 2800 (media de 720 bacterias). Barras 19 a 24: log de la concentración de bacterias recuperadas de animales tratados con anticuerpo (500 μg) + vancomicina. MBV1: 130; MBV2: 20; MBV3: 10; MBV4: 80; MBV5: 20 (media de 56 bacterias).

5. Ensayos de avidéz

Resultados de las pruebas de avidéz de los clones de anticuerpos monoclonales 10 y 38:

Avidéz del protocolo de urea:

clon 10: 1,03/1,46 (lectura de las DO con/sin tratamiento) = **70,5 %**

clon 38: 1,00/1,21 = 82,6 %

Avidéz del protocolo de tiocianato de amonio:

Clon 10 (DO):

Control: 1,12

Muestras tratadas con tiocianato:

2 M = 0,046; 1,5 M = 0,047; 1 M = 0,107; 0,75 M = 0,483; 0,5 M = 0,602; 0,375 M = 0,684

Tasa de avidéz: **2,47**

Clon 38 (DO):

Control: 1,22

Muestras tratadas con tiocianato:

2 M = 0,056; 1,5 M = 0,062; 1 M = 0,129; 0,75 M = 0,648; 0,5 M = 0,758; 0,375 M = 0,793

Tasa de avidéz: **4,40**

Se ve que las tasas de avidéz del clon 38 fueron más altas que las del clon 10 en ambos ensayos. Adicionalmente, se verifica que, de acuerdo con ambos protocolos, fue necesario usar 50 veces más anticuerpos del clon 10 que del clon 38 para alcanzar una DO cercana a 1,0.

6. Determinación de las constantes de asociación y disociación de los anticuerpos monoclonales (clones 10 y 38 por el método de resonancia de plasmón superficial [SPR] [BIAcore])

Los resultados obtenidos por el método SPR confirmaron los resultados preliminares de la avidéz de anticuerpos, donde el clon 38 mostró resultados superiores a los del clon 10 nuevamente. Según los datos vistos en la **Tabla II**, se ve que el clon 38 muestra afinidad 450 veces mayor que el clon 10.

Esta afinidad se debe principalmente a su mayor índice de asociación, que es aproximadamente 100 veces más alto que el clon 10 uno. Debido a la muy alta afinidad del clon 38, **sus medidas presentan parámetros cercanos al umbral de detección del equipo**. Sin embargo, debido a la atención en la planificación y dirección de ensayos, se obtuvo un ajuste excelente para los datos de prueba utilizando el modelo de Langmuir, lo que indica que los datos obtenidos son fiables.

La Figura 9 muestra la interacción entre PBP2a recombinante (antígeno) y el clon 38 de los anticuerpos monoclonales (Figura 9A) y el clon 10 (Figura 9B). Las curvas de trazos ahumados representan los datos SPR en las concentraciones de acuerdo con la clave correcta. Todas las muestras se analizaron por duplicado, y el modelo teórico de Langmuir 1:1 para cada curva se muestra en negro debajo de cada curva. Las unidades de respuesta se representan en el eje vertical y el tiempo se representa en la línea horizontal en segundos. Las líneas más cercanas que se refieren al eje horizontal representan la línea base para cada muestra (control negativo).

Tabla II

Constantes de disociación e interacción entre el antígeno (PBP2a) y los clones 10 y 38 de los anticuerpos monoclonales.

5

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
Clon 10	$4,42 \times 10^3 \pm 5,7$	$1,16 \times 10^{-4} \pm 5,63 \times 10^{-7}$	26,2
Clon 38	$5,45 \times 10^5 \pm 384$	$3,13 \times 10^{-5} \pm 2,11 \times 10^{-10}$	$5,7 \times 10^{-2}$

7. Identificación de regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal anti-PBP2a

- 10 Después del proceso de extracción de ARNm en las células de hibridoma del clon que produce los anticuerpos usados (clon 38), se realizó la obtención de ADNc y se realizaron reacciones de PCR con este material para diferentes alelos de cadena ligera y pesada. Los materiales obtenidos se sometieron a secuenciación usando las mismas secuencias de inicio (definidas por la SEQ ID NO.: 18 a SEQ ID NO.: 39) utilizado en reacciones de PCR. La cadena ligera 391 y la cadena pesada 310 se identificaron en tres secuencias distintas. Aplicando los algoritmos de
- 15 Kabat y Chotia, se obtiene la identificación de CDR de cadena ligera y pesada, los cuales son el objetivo de las reclamaciones adjuntas.

Los inventores presentan las secuencias de CDR de cadena ligera y pesada a continuación.

- 20 SEQ ID NO.: 6 - aminoácidos de la CRD1 de la cadena ligera.

RSSQSIGHNSNGNTYLE

SEQ ID NO.: 7 - aminoácidos de la CDR 2 de la cadena ligera.

KVSNRFS

SEQ ID NO.: 8 - aminoácidos de la CDR 3 de la cadena ligera.

- 25 **FQGSYVPLT**

SEQ ID NO.: 9 - ADN de CDR 1 de la cadena ligera.

cgcagcagccagagcattggccatagcaacggcaacacctatctgga

SEQ ID NO.: 10 - ADN de CDR 2 de la cadena ligera.

aaagtgagcaaccgcttagc

- 30 SEQ ID NO.: 11 - ADN de CDR 3 de la cadena ligera.

ttcagggcagctatgtgccgctgacc

SEQ ID NO.: 12 - aminoácidos de CDR 1 de la cadena pesada.

GFSITSSSSCWH

SEQ ID NO.: 13 - aminoácidos de CDR 2 de la cadena pesada.

- 35 **RICYEGSISYSPSLKS**

SEQ ID NO.: 14 - aminoácidos de CDR 3 de la cadena pesada.

ENHDWFFDV

SEQ ID NO.: 15 - ADN de CDR 1 de la cadena pesada.

ggcttagcattaccagcagcagcagctgctggcat

- 40 SEQ ID NO.: 16 - ADN de CDR 2 de la cadena pesada.

cgcttgcctatgaaggcagcattagctatagcccagcctgaaaagc

SEQ ID NO.: 17 - ADN de CDR 3 de la cadena pesada.

gaaaacctgattggtttttgatgtg

- 45 **Datos complementarios**

Se realizaron otros ensayos adicionales, procediendo al desarrollo de la invención. Estos se indican a continuación, a través de ejemplos.

- 50 **Ejemplo 3**

Se realizó un segundo estudio con la cepa CEB MRSA, siguiendo el mismo protocolo descrito en el Ejemplo 1, punto 7.2, con la adición de dos pulsos de agitación mediante vórtex, de 15 segundos cada uno, después de cada lavado; con el objetivo de desagregar los aglomerados de *Staphylococcus aureus* y aumentar la cantidad de PBP2a

55 expuesta a los anticuerpos.

Se probaron los marcadores FITC (isotiocianato de fluoresceína) y PE (ficoeritrina), con muestras de control (i. bacteria pura, sin contacto con anticuerpo monoclonal; y ii. bacteria pura más marcador FITC o PE) y la muestra tratada con anticuerpo monoclonal y sometida a marcado con PE o FITC que se analiza. Las lecturas en el

60 dispositivo FACsalibur se realizaron en modo lineal.

La Figura 10 es un gráfico de análisis por citometría de flujo de muestras de MRSA en presencia de anticuerpo anti-PBP2a marcado con FITC. La curva (x) corresponde a la muestra no marcada, y la curva (y) corresponde a la

muestra marcada.

Los resultados obtenidos mostraron que el dispositivo detectó aproximadamente el 22 % de la población marcada, confirmando el reconocimiento del objetivo (PBP2a) presente en la superficie bacteriana por los anticuerpos anti-PBP2a (Figura 10).

Ejemplo 4

Los inventores aún estudiaron la protección conferida por el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a del *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina contra enterococos. De acuerdo con lo que ya se ha mencionado anteriormente en el presente documento, el anticuerpo reconoce las proteínas presentes en cepas de *Enterococcus* sp., probablemente PBP5, una transpeptidasa con baja afinidad por betalactámicos, presente en todas las cepas de enterococos, con peso molecular de aproximadamente 76 kDa (237 aminoácidos). Esta enzima presenta homología que se refiere a PBP2a de MRSA, de acuerdo con la alineación (ClustalW) relacionada a continuación:

```

PBP5Efas      MERSNRNKKSSKNPLILGVSALVLIAAAVGGYYAYSQWQAKQELAEAKKTATFFLNVL 60
PBP5efam      -----KHGKNRTGAYIAG--AVILIAAAGGGYFYQHYQETQAVEAGEKTVEQFVQALNK 53
PBP2a         -----MKKIKIVPLILIVVVVGGFIYFYASKDKEINNTIDAIEDKNFKQVYKD 48
                *      : : : : : * : * :
                *      : : : : : * : * :

PBP5Efas      QEFDKLPSVVQEASLKKNGYDTKSVVEKYQAIYSGIQAEVKSADVQVKKAKDNQYFTY 120
PBP5efam      GDYNKAAEMTSKKAANKSALSEKEILDYQNIYGAADVKGQLISNLKVDKDDSTYSFSY 113
PBP2a         -----ISKSDNGEVEMTERPIKIYNSLVGKDINIQRKIKKVKSNKKRVD 97
                . :      . * . . . : : : * * . . . : : : : * . . .

PBP5Efas      KLSMSTPLGEMKDLSYQSSIAKKGDYQIAWKPSLIFPDMMSGNDKISIQVDNAKRGEIVD 180
PBP5efam      KAKMNTSLGELKDLKSYKGLDRNDGQTTINWQPNLVFPEMEGNDKVSLLTQEAARGNIID 173
PBP2a         QYKIKTNYGNIDRN-VQFNFKEDGMWKLWDHDSVIPGMQKQDSIHENLKERGKILD 156
                : . : * * : : : : : : * . . : : * * . : : : : * : * : *

PBP5Efas      RNSGLAINKVFEVGVVPGKLGSGAEKTANIKAFSDKFGVSVDEIN---QKLSQGWVQA 237
PBP5efam      RNGEPLATTGKLGKQVGVVPSKLGDGDEKTANIKAIASSFDLTEDA IN---QAISQSWVQP 230
PBP2a         RNNVELANTGTHMRLGI VPKNVS----KDYKAIKELISEDY INNKWIKIGYKMPIS 211
                ** . ** . . : : * * : : . : * : : : : : * * . . . : .

PBP5Efas      DSFVPI TVASEPVTELP TG--AATKDTESRYPLGEACAINR-VYGTITAEDIEKN--PE 292
PBP5efam      DYFVPLKIDGATPELPAG--ATIQEVDGRYPLGEAAAQLIGYVDITAEDI DKN--PE 286
PBP2a         FHFKT VKKMDEYLSDFAKKFLHTTNETESRNYPLEKATSHLLGYPINSEELKQEKYK 271
                * . . . . . : : : : * * * * : * * : * : : : :

PBP5Efas      LSSTGVIGKTGLEAFDKEIRGQDGGSLVILDDK-ENVKKALQTKKKGQTTIKLTIDSG 351
PBP5efam      LSSNGKIGRSGLEMAFDKDLRGTGGKLSITDAD-GVEKKVIEHEVQNGDKIKLTIDAK 345
PBP2a         YKDDAVIGKKGLEKLYDKKLQHEGDYRVTI VDDNSNTIAHTLIEKKKDGKDIQLTIDAK 331
                . . . * : * * * * : * : * * . . . : * : : : * : * * * :

PBP5Efas      VQQQAF AIFDKRPGSAVITDPQKGDLLATVSSPSYDPNKMANGI SQKEYDAYNNKDLPF 411
PBP5efam      AQKTAFDSLGGKAGSTVATTPKTGDLLALASSPSYDPNKMMTNGLSQEDYKSYEENPEQPF 405
PBP2a         VQKSTYNNMKNYDGSFTAHPQTGELLALVSTPSYDVYPFMYGMSNEEYNKLTEDKKEPL 391
                . * : : : * * . * : * * * * * : * * * * * : : * : *

PBP5Efas      TARFATGYAPGSTFKIITGAIGLDAGTLKPDEELEINGLKWQDKKSWGYPATRVKEAS- 470
PBP5efam      ISRFATGYAPGSTFKMITAAIGLDNGTIDPNEVLTINGLKWQDKSSWGSYQVTRVSDVS- 464
PBP2a         LNKFQITTSPGSTQKILTAMIGLNNKTLDDKTSYKIDGKGWQDKKSWGYNVTRYEVVNG 451
                : * : * * * * * : * : * * * * * : * : * * * * * : * : * *

PBP5Efas      PVNLRTALVNSDNIYFAQQTLRMGEDKFRAGLNKFI FGEELDLPIAMTPAQISNEDKFNS 530
PBP5efam      QVDLKTALIYSDNIYTAQETLKMGEKKFRIGLDKFI FGEDLDLPI SMNPAQISNEDSFNS 524
PBP2a         NIDLKQAI ESSDNIFFARVALELGSKKFEKGMKLVGVEDIPSDY PFYNAQISNKN-LDN 510
                : : * : * * * * * : * : * * * * * : * : * * * * * : : :

PBP5Efas      EILLADTYGGQGLLISPIQQATMYSVFNQNGTLVYPKLVLDKETKK-KDNVISANAANT 589
PBP5efam      DILLADTYGGQGLLINPIQQAAMYSVFANNGLTVYPKLIADKETK-KKNVIGETALQT 583
PBP2a         EILLADSGYGGQGEILINPVQILSIYSALENNGNINAPHLLKDTKNKVVKKNIISKENINL 570
                : * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * :

PBP5Efas      IATDLLGSVEDPSGYVYNMYPNPNFLAAKTGTAETKDKQTDGKENSFLLTLDRSNNKFL 649
PBP5efam      IVPDLREVVDVNGTAHLSALGIPLAAKTGTAETKEKQDVKGKENSFLFAFNPDNQGYM 643
PBP2a         LNDGMQQVNV--KTHKEDIYRSYANLIGKSGTAE LKMKQGESGRQIGWFISYDKDNPNMM 628
                : . : * : . . : * . * * * * * * . * : : : : : * :

PBP5Efas      TMIMVENSGENSATDISKPLIDYLEATIK----- 679
PBP5efam      MVSMLNKKEDDSDATKRASELLQYLNQNYQ----- 673
PBP2a         MAINVKDVQDKGMASYNAKISGKVYDELYENGNKKYDIDE 668
                : : : . . * : . . : : :
    
```

La alineación se realizó con secuencias correspondientes a PBP5 de los enterococos *E. faecalis* (Efas) y *E. faecium* (Efam) con PBP2a de MRSA. Secuencias marcadas (negrita - PBP5; subrayado - PBP2a) corresponde a la región PBP2a utilizada para generar anticuerpos monoclonales. Los aminoácidos correspondientes al núcleo activo de la enzima están marcados en cursiva.

Así, ensayos de protección *in vitro*, determinación de la dosis letal y DL_{50} , y se realizaron ensayos *in vivo* (dosis subletal con cuantificación renal y ensayo de supervivencia con dosis letal) con una cepa de enterococo en el modelo murino (ratones Balb/C), como se realizaron anteriormente con MRSA. Estos resultados se pueden ver en los informes correspondientes.

1.1. Ensayos de protección *in vitro*

El objetivo de este ensayo fue evaluar la protección *in vitro* conferida por el anticuerpo contra la cepa de enterococo VRE.

Prueba de protección *in vitro* (CMI), clon 38 de anticuerpo monoclonal purificado (90/DA5/CB5/AA3 hib 77) contra la cepa clínica de *Enterococcus f.* (VRE), Richet laboratory.

Condiciones:

Muestra: purificada del sobrenadante por HPLC, Resina SelecSure MAB, dializada, liofilizada.

Cuantificación de anticuerpos (método de Lowry): 3,5 mg/ml

Inóculo: Cepa VRE

Preinóculo: 1 colonia de VRE en 20 ml de Lb y vancomicina (10 mg/ml), A 37 °C, 160 rpm

Inóculo: 400 ml de preinóculo en 20 ml de Lb, Erlenmayer de 200 ml, 37 °C, 160 rpm, lectura de la $DO_{600\text{ nm}}$ tras 7 horas: 0,7

Cuantificación: 5,5 x 10⁸ bacterias/ml

Condiciones de ensayo:

Inóculo: 5,5 x 10⁵ bacterias

Concentraciones de anticuerpo: 300, 400, 500, 600 y 700 mg de anticuerpo

Medio de cultivo: 1 ml de caldo Luria

Placa de cultivo celular, 24 cavidades

Control positivo: Caldo Luria + inóculo bacteriano

Control negativo: Caldo Luria

Incubación: 18 horas, 37 °C

La figura 11 muestra el resultado de la evaluación de la protección conferida por el anticuerpo. En la Figura 11, se tiene:

- 40 A. 300 mg de anticuerpo
- B. 400 mg de anticuerpo
- C. 500 mg de anticuerpo
- D. 600 mg de anticuerpo
- E. Control negativo
- 45 F. Control positivo
- G. 700 mg de anticuerpo

1.2. Determinación de la DL_{50} y la dosis letal por vía intraperitoneal - *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina

Protocolo:

Animales Balb/C hembra de 7 semanas, peso medio de 20 gramos

Día 01 - preinóculo: 1 colonia de cepas VRE en 10 ml de caldo Lb y vancomicina (10 mg/ml), Tubo Falkow de 50 ml, crecimiento a 37 °C, 160 rpm

55 Día 02 - inóculo: 1 ml de preinóculo en 50 ml de caldo Lb/vancomicina (erlenmayer de 250 ml) - 4 viales, 37 °C, 160 rpm, crecimiento hasta $DO_{600\text{ nm}} = 0,80$

centrifugación durante 10 min, 4.000 rpm, resuspensión en PBS 1x estéril, DO 1,2

Cuantificación: 2,1 x 10⁵ bacterias/ml

A. 60 microlitros (1,5 x 10⁷)

60 B. 300 microlitros (6,5 x 10⁷)

C. 900 microlitros (reducido a 300 microlitros/dosis) (1,5 x 10⁸)

D. 4,5 ml (reducido a 300 microlitros/dosis) (6,5 x 10⁸)

E. 9,0 ml (1,2 x 10⁹ bacterias) (reducido a 300 microlitros/dosis)

F. 45,0 ml (6,5 x 10⁹ bacterias) reducido a 300 microlitros/dosis

65 La observación del animal se realizó desde el día 02 hasta el décimo día del ensayo.

El resultado se muestra en la Figura 12 y se concluye que la dosis letal es $1,2 \times 10^9$ bacterias y la DL_{50} es $6,5 \times 10^8$ bacterias.

5 **Cuantificación renal de animales supervivientes al séptimo día:**

A ($1,5 \times 10^7$): sin crecimiento bacteriano

B ($6,5 \times 10^7$): sin crecimiento bacteriano

C ($1,5 \times 10^8$): 3.100 bacterias

10 D ($6,5 \times 10^8$): $2,8 \times 10^4$ bacterias

1.3. Prueba de protección *in vivo* - prueba de supervivencia - dosis letal, infección sistémica por vía intraperitoneal en un modelo murino

15 El objetivo de este ensayo fue evaluar la eficacia de la protección *in vivo* para el anticuerpo monoclonal anti-PBP2a contra la infección sistémica con dosis letales, Cepa de *Enterococcus faecium* (VRE).

1. Anticuerpo (purificado del sobrenadante del cultivo celular en medio con suero)

- Muestra purificada dializada y liofilizada (HPLC SelecSure MAB), resuspendida y filtrada antes de su uso.

20 - Cuantificación (método de Lowry): 1,0 mg/ml

2. Modelo murino: Animales Balb/C hembra de 8 semanas, peso de 23 a 25 gramos

3. Protocolo:

grupo A (6 animales): 650 mg de anticuerpo (350 mg + 300 mg)

grupo B (6 animales): control (administración de solución salina)

25 **4. Preparación de inóculo bacteriano:**

Cepa **VRE:**

preinóculo, día 01, 10 ml de caldo BHI y vancomicina a 10 mg/ml A, 37 °C, 160 rpm

inóculo, día 03: 300 ml de preinóculo en 30 ml de BHI y vancomicina, DO_{600} de 1,31, centrifugado durante 10 min,

30 4.000 rpm, resuspendido en PBS estéril 0,5x, ajuste a una $DO = 1,10$, diluciones y placas para cuantificación ($2,0 \times 10^8$ bacterias/ml); inóculo: 12 ml, centrifugado resuspendido en 300 ml, vía IP ($\sim 2,2 \times 10^9$ bacterias)

Calendario:

Día 01: Inoculación IP de anticuerpos (350 mg)

Día 02: Inoculación IP de anticuerpos (300 mg), infección sistémica por la tarde (IP, 250 ml de solución bacteriana - $2,2 \times 10^9$ bacterias)

35 Día 02 al Día 13: observación de los animales.

Los resultados se muestran en la Figura 13. Solo 2 animales tratados murieron (66,6 % de protección). Todos los animales de control murieron al segundo día.

40 **1.4. Prueba de protección *in vivo*: infección sistémica por vía intraperitoneal en modelo murino con *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina**

El objetivo fue evaluar la eficacia de la protección *in vivo* del anticuerpo monoclonal anti-PBP2a y PBP5 de enterococos contra la infección sistémica, cepa de *E. faecium* (VRE).

45

Prueba:

1. Anticuerpo (purificado del sobrenadante del cultivo celular en medio con suero)

- Muestra purificada, dializada, liofilizada y resuspendida (AffiPrep ProteinA Biorad/HPLC SelecSure MAB).

- Cuantificación (método de Lowry): 1,5 mg/ml

50 **2. Modelo murino:** hembra, Animales Balb/C de 8 semanas, peso de 19 a 23 gramos

3. Protocolo:

grupo A (4 animales): 500 microgramos de anticuerpo (en 2 meses, d01, d02)

grupo B (4 animales): control no protegido

4. Preparación de inóculo bacteriano:

55 Cepa de MRSA ibérica:

preinóculo, 10 ml de caldo Lb A, 37 °C, 120 rpm

inóculo: 200 microlitros de preinóculo en 20 ml de Lb, DO_{600} de 0,80, centrifugado durante 10 min, 4.000 rpm,

resuspendido en PBS estéril 0,5x, ajuste a una $DO = 0,51$, diluciones y placas para cuantificación ($2,4 \times 10^8$ bacterias/ml); inóculo: 500 microlitros, Vía IP ($2,4 \times 10^8$ bacterias)

60 **Calendario:**

Día 01: inoculación de 250 microgramos de anticuerpo por vía intraperitoneal

Día 02: inoculación de 250 microgramos de anticuerpo por vía intraperitoneal e infección sistémica (intraperitoneal, 500 microlitros de solución bacteriana)

Día 06: eutanasia, cuantificación bacteriana en riñones

65

Según los resultados anteriores, se puede destacar que:

Ensayos de protección *in vitro*: determinación de la concentración mínima inhibitoria:

Un total de 700 microgramos de anticuerpos puede bloquear el crecimiento de 550.000 bacterias. Estos valores son más altos que la CMI obtenida para las cepas MRSA, que eran aproximadamente 500 microgramos.

Ensayos de protección *in vivo*:

Prueba de protección *in vivo*: infección sistémica por vía intraperitoneal en modelo murino con dosis subletal de *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina.

Los animales recibieron 500 microgramos de anticuerpo monoclonal, por vía intraperitoneal (IP), y fueron sometidos a infección sistémica, Vía IP, con $2,4 \times 10^8$ bacterias. Cuatro días después, fueron sometidos a eutanasia y extirpación de los riñones para cuantificación bacteriana. Los animales tratados presentaron una media de 87,5 bacterias/animal, mientras que los controles (animales infectados no tratados) presentaron una media de 211.000 bacterias/animal.

Prueba de supervivencia después de la administración de la dosis letal

Los animales recibieron 650 microgramos de anticuerpo monoclonal (vía IP) y fueron sometidos a infección sistémica (vía IP) y observados diariamente durante 10 días. Los animales de control (no tratados) murieron hasta el segundo día después de la infección; dos de los animales tratados (6) murieron al segundo día; los otros permanecieron vivos hasta el final del ensayo. La tasa de supervivencia fue del 66,6 %.

Por lo tanto, una vez más, se confirmó que el anticuerpo monoclonal anti-PBPa de MRSA demostró conferir protección cruzada contra enterococos. Sin embargo, las dosis necesarias para conferir protección fueron más altas que las utilizadas contra MRSA en condiciones similares. Esto probablemente se deba a la menor capacidad del anticuerpo para reconocer PBP5 con la misma eficacia que PBP2a, para lo cual se desarrolló.

Por lo tanto, la presente invención descrita en el presente documento, anticuerpos monoclonales anti-PBP2a, capaces de unirse específicamente a PBP2a y secuencias homólogas, tiene aplicabilidad en infecciones causadas por bacterias que presentan esta proteína o sustancias similares (MRSA, MRSE y *Enterococcus* spp., y cualquier otro patógeno que tenga una proteína homóloga a PBP2a).

Es importante enfatizar que una vez que estas infecciones son un problema mundial y que los ensayos se realizaron contra los principales clones de MRSA epidémicos conocidos, el producto de la presente invención tiene aplicación en cualquier lugar donde haya infecciones por este patógeno.

Los documentos relativos al estado de la técnica del conocimiento de los inventores, citados en el presente informe descriptivo, se enumeran a continuación.

1. KOPP, BJ. NIX DE, ARMSTRONG EP. Clinical and economic analysis of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* infections. The Annals of Pharmacotherapy; 38: 1377-82. 2004.

2. BOYCE, JM. Are the epidemiology and microbiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* changing? JAMA; 279(8):623-4. 1998.

3. HUNT, C; DIONNE M, et. al. Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota and North Dakota, 1997-1999. Morbidity and Mortality weekly report-CDC USA. 48(32):707-10. 1999.

4. O'BRIEN, FG; PEARMAN, JW; GRACEY, M; RILEY, TV. GRUBB, WB. Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. Journal of Clin Microbiol. 37(9):2858-62. 1999.

5. TENOVER, FC; LANCASTER, MV; HILL, BC; STEDWARD, CD; STOCKER, SA; HANCOCK, GA; et. al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. Journal of Clin Microbiol. 36(4): 1020-27. 1998.

6. LUTZ, L; MATOS, SB; KUPLICH, N; MACHADO A; BARTH AL. Características laboratoriais de *Staphylococcus aureus* isolado de paciente que não respondeu ao tratamento com vancomicina. Primeiro Encontro de Controle de Infecção Hospitalar do MERCOSUL. 1999.

7. COSGROVE, SE; CARROLL, KC; PERL, TM. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Clin Infect Diseases. 39(4):539-45. 2004.

8. JARVIS, WR; SCHLOSSER JMA, CHINN RY, TWETTEN S, JACSON M. National prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in inpatients at US health care facilities, 2006. Am J Infect Control. 35(10):631-7.

2007.

9. YAMAUCHI, M. Japan struck by resistant *Staphylococcus aureus*. British Medical Journal. 306:740. 1993.
- 5 10. PANLILIO, AL; CULVER, DH; GAYNES, RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in US hospitals, 1975-1991. Infection Control and Hospital Epid. 13: 582-86. 1992.
11. LOWRY, F. *Staphylococcus aureus* infections. New England Journal of Medicine. 339: 520-32. 1998.
- 10 12. FARR, BM. Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Current Opinion Infectious Diseases. 17: 317-22. 2004.
13. TIEMERSMA, EW; BRONZWA, ER; SLAM, *et. al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. Emerging Infectious Diseases. 10:1627-34, 2004.
- 15 14. BERETTA, ALRZ; TRABASSO, P.; STUCCHI, RB; MORETTI, ML. Use of molecular epidemiology to monitor the nosocomial dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an University hospital from 1991-2001. Braz. Journal of Medical and Biological Research. 37: 1345-51. 2004.
- 20 15. PANNUTI, CS; GRINBAUM, RS. An overview of nosocomial infection control in Brazil. Infection Control and Hospital Epidemiology. 16(3):170-74. 1995.
16. RESENDE, EM; COUTO, BRGM; STARLING, CEF; MODENA, CM. Prevalence of nosocomial infections in general hospitals in Belo Horizonte. Infection Control and Hospital Epidemiology. 19(11):872-76. 1998.
- 25 16a. Grundmann H., Aires de Souza M., Boyce J. and Tiemersma J. Emergence and resurgence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public threat health. Lancet. 2006. 368: 874-85.
17. GUIGNARD, B; ENTENZA, JM; MOREILLON P. Beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr. Opin Pharmacol. 5(5):479-89. 2005.
- 30 18. SENNA, JP; ROTH, DM; OLIVEIRA, JS; MACHADO, DC, SANTOS DS. Protective immune response against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a murine model using a DNA vaccine approach. Vaccine. 21: 2661-66,2003.
- 35 19. OHWADA, A; SEKIYA, M; HANAKI, H; ARAI, KK; HIRAMATSU, K, FUKUCHI,Y. DNA vaccination by *mecA* sequence evokes an antibacterial immune response against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents and Chemother. 44: 767-74. 1999.
- 40 20. DOMBROWSKI, JC; WINSTON, LG. Clinical failures of appropriately-treated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. J. Infect. 57(2):110-5. 2008.
- 20bis. RYFFEL, C; TESCH, W; BICH-MACHIN, I.; REYNOLDS, PE; BARBERIS-MAINO, L; KAYSER, FH; BERGER-BACHI, B. Sequence comparison of *mecA* genes isolated from methicillin-resistant *S. aureus* and *S. epidermidis*. Gene. 94: 137-38. 1990.
- 45 21. ROTH, DM; SENNA, JP; MACHADO, DC. Evaluation of the humoral immune response in BALB/c mice immunized with a naked DNA vaccine anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Genetics Molecular Research. 5(3):503-12. 2006.
- 50 22. YOKOYAMA, W. Production of monoclonal antibodies: induction of immune responses, p. 2.5.4-2.5.8. En: J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach y W. Strober (ed). Current Protocols in Immunology, vol. 1. Wiley and Sons, Hoboken, N.J. 1995.
- 55 23. REED, LJ y MUENCH H. Am. J. Hyg. 27: 493-97. 1938.
24. KABAT, EA; WU, TT; BILOFSKY, H; M REID-MULLER, PERRY, Sequences of proteins of immunological interest. National Institutes of Health, Bethesda. 1993.
- 60 25. CHOTIA, C; LESK, AM; TRAMONTANO, A; LEVITT, M; SMITH-GILL, PADLAN, EA; DAVIES, D; TULIP, WR. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature, 342: 877-883. 1989.
26. GOULD IM. The clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Hospital Infections, 61(4):277-82. 2005.
- 65 27. ANDREMONT, A; TIBON-CORNILLOT, M. Le triomphe des bacteries, la fin des antibiotiques? Ed Max Milo, 1

ed, 2007.

28. Silverstein, Arthur M. *Paul Ehrlich's receptor immunology*. San Diego: Academic Press, 2002.

5 29. LIM, D; STRINADKA NC. Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol*. 9(11): 870-6. 2002.

10 30. PAPAKYIRIAKOU, H; VAZ, D; SIMOR, A; LOUIE M; MCGAVIN MJ. Molecular analysis of the accessory gene regulator (*agr*) locus and balance of virulence factor expression in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 181(3):2400-4. 2000.

15 31. TEIXEIRA, LA; RESENDE, CA; ORMONDE, LR; ROSENBAUM, R; FIGUEIREDO AM, DE LENCASTRE H, TOMASZ A. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil. *J Clin Microbiol*. 33(9):2400- 4.1995.

32. DA SILVA, COIMBRA MV; TEIXEIRA, LA; RAMOS, RL; PREDARI, SC; CASTELLO, L; FAMIGLIETTI A, VA, C; KLAN, L; FIGUEIREDO AM. Spread of the Brazilian epidemic clone of a multiresistant MRSA in two cities in Argentina. *J Med Microbiol*. 49(2):187-92. 2000.

20 33. SENNA, JP; PINTO, CA; MATEOS, S; QUINTANA, A; SANTOS DS. Spread of a dominant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clone between Uruguayan and South Brazil Hospitals. *J Hospital Infect*. 53(2):15607. 2003.

25 34. MELTER, O; SANTOS SANCHES, I; SCHINDLER, J; AIRES DE SOUZA, M; KOVÁROVA, V; ZEMLICKOVÁ, H; DE LENCASTRE H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic. *J Clin Microbiol*, 37(9):2798-803. 1999.

30 35. DA SILVA COIMBRA MV, SILVA-CARVALHO MC; WISPLINGHOFF H; HALL GO; TALLENT S; WALLACE, S; EDMOND, MB; FIGUEIREDO, AM; WEINZEL, RP. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large geographic area of the United States. *J Hosp Infect*. 53(2):103-10. 2003.

36. NYGAARD, TK; DELEO, FR; VOYICH, JM. Community-associated methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* skin infections: advances toward identifying the key virulence factors. *Curr Op Infect Dis*. 21(2):147-52. 2008.

35 37. DIEP, BA; CHAMBERS, HF; GRABER, CJ; SZUMOWSKI, JD; MILLER, LG; HAN, LL; CHEN, JH; LIN, F; *et. al*. Emergence of multidrug-resistant, community- associated, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in men who have sex with men. *Ann Intern Med*. 148(4):249-57. 2008.

40 38. REICHERT, JM; DEWITZ, MC. Anti-infective monoclonal antibodies: perils and promise of development. *Nat Rev Drug Discov*. 5(3):191-5. 2006.

39. GAO, J; STEWART, GC. Regulatory elements of the *Staphylococcus aureus* protein A (*Spa*) promoter. *J Bacteriol*. 186(12):3738-48. 2004.

45 40. GOFFIN, C; GHUYSEN JM. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and parologs. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62(4):1079-93. 1998.

41. COURVALIN P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*. 1;42 Suppl 1:S25-34. 2006.

50 42. BAILIE GR, NEAL D. Vancomycin ototoxicity and nephrotoxicity. *Med Toxicol Adverse Drug Exp*. 3: 376-86. 1988.

55 43. SALGUERO E; PLAZA D; MARINO A; MORENO C; DELGADO G. Characterising vancomycin's immunotoxic profile using Swiss and CFW mice as an experimental model. *Biomed Pharmacother*. Sept 16. 2008.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación Oswaldo Cruz
Fundación Oswaldo Cruz

<120> Anticuerpos monoclonales

<130> P1704

<160> 39

ES 2 773 920 T3

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 668

5 <212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> secuencia de aminoácidos de PBP2a

<400> 1

Met Lys Lys Ile Lys Ile Val Pro Leu Ile Leu Ile Val Val Val Val
1 5 10 15

Gly Phe Gly Ile Tyr Phe Tyr Ala Ser Lys Asp Lys Glu Ile Asn Asn
20 25 30

Thr Ile Asp Ala Ile Glu Asp Lys Asn Phe Lys Gln Val Tyr Lys Asp
35 40 45

Ser Ser Tyr Ile Ser Lys Ser Asp Asn Gly Glu Val Glu Met Thr Glu
50 55 60

Arg Pro Ile Lys Ile Tyr Asn Ser Leu Gly Val Lys Asp Ile Asn Ile
65 70 75 80

Gln Asp Arg Lys Ile Lys Lys Val Ser Lys Asn Lys Lys Arg Val Asp
85 90 95

Ala Gln Tyr Lys Ile Lys Thr Asn Tyr Gly Asn Ile Asp Arg Asn Val
100 105 110

Gln Phe Asn Phe Val Lys Glu Asp Gly Met Trp Lys Leu Asp Trp Asp
115 120 125

His Ser Val Ile Ile Pro Gly Met Gln Lys Asp Gln Ser Ile His Ile
130 135 140

Glu Asn Leu Lys Ser Glu Arg Gly Lys Ile Leu Asp Arg Asn Asn Val
145 150 155 160

Glu Leu Ala Asn Thr Gly Thr Ala Tyr Glu Ile Gly Ile Val Pro Lys
165 170 175

15

ES 2 773 920 T3

Asn Val Ser Lys Lys Asp Tyr Lys Ala Ile Ala Lys Glu Leu Ser Ile
180 185 190

ser Glu Asp Tyr Ile Lys Gln Gln Met Asp Gln Asn Trp Val Gln Asp
195 200 205

Asp Thr Phe Val Pro Leu Lys Thr Val Lys Lys Met Asp Glu Tyr Leu
210 215 220

Arg Asp Phe Ala Lys Lys Phe His Leu Thr Thr Asn Glu Thr Glu Ser
225 230 235 240

Arg Asn Tyr Pro Leu Gly Lys Ala Thr Ser His Leu Leu Gly Tyr Val
245 250 255

Gly Pro Ile Asn Ser Glu Glu Leu Lys Gln Lys Glu Tyr Lys Gly Tyr
260 265 270

Lys Asp Asp Ala Val Ile Gly Lys Lys Gly Leu Glu Lys Leu Tyr Asp
275 280 285

Lys Lys Leu Gln His Glu Asp Gly Tyr Arg Val Thr Ile Val Asp Asp
290 295 300

Asn Ser Asn Thr Ile Ala His Thr Leu Ile Glu Lys Lys Lys Lys Asp
305 310 315 320

Gly Lys Asp Ile Gln Leu Thr Ile Asp Ala Lys Val Gln Lys Ser Ile
325 330 335

Tyr Asn Asn Met Lys Asn Asp Tyr Gly Ser Gly Thr Ala Ile His Pro
340 345 350

Gln Thr Gly Glu Leu Leu Ala Leu Val Ser Thr Pro Ser Tyr Asp Val
355 360 365

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

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

Pro Gly Ser Thr Gln Lys Ile Leu Thr Ala Met Ile Gly Leu Asn Asn
405 410 415

Lys Thr Leu Asp Asp Lys Thr Ser Tyr Lys Ile Asp Gly Lys Gly Trp
420 425 430

Gln Lys Asp Lys Ser Trp Gly Gly Tyr Asn Val Thr Arg Tyr Glu Val
435 440 445

Val Asn Gly Asn Ile Asp Leu Lys Gln Ala Ile Glu Ser Ser Asp Asn

ES 2 773 920 T3

450 455 460

Ile Phe Phe Ala Arg Val Ala Leu Glu Leu Gly Ser Lys Lys Phe Glu
 465 470 475 480

Lys Gly Met Lys Lys Leu Gly Val Gly Glu Asp Ile Pro Ser Asp Tyr
 485 490 495

Pro Phe Tyr Asn Ala Gln Ile Ser Asn Lys Asn Leu Asp Asn Glu Ile
 500 505 510

Leu Leu Ala Asp Ser Gly Tyr Gly Gln Gly Glu Ile Leu Ile Asn Pro
 515 520 525

Val Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Ala Leu Glu Asn Asn Gly Asn Ile
 530 535 540

Asn Ala Pro His Leu Leu Lys Asp Thr Lys Asn Lys Val Trp Lys Lys
 545 550 555 560

Asn Ile Ile Ser Lys Glu Asn Ile Asn Leu Leu Thr Asp Gly Met Gln
 565 570 575

Gln Val Val Asn Lys Thr His Lys Glu Asp Ile Tyr Arg Ser Tyr Ala
 580 585 590

Asn Leu Ile Gly Lys Ser Gly Thr Ala Glu Leu Lys Met Lys Gln Gly
 595 600 605

Glu Thr Gly Arg Gln Ile Gly Trp Phe Ile Ser Tyr Asp Lys Asp Asn
 610 615 620

Pro Asn Met Met Met Ala Ile Asn Val Lys Asp Val Gln Asp Lys Gly
 625 630 635 640

Met Ala Ser Tyr Asn Ala Lys Ile Ser Gly Lys Val Tyr Asp Glu Leu
 645 650 655

Tyr Glu Asn Gly Asn Lys Lys Tyr Asp Ile Asp Glu
 660 665

<210> 2
 <211> 2007
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> ácido nucleico del gen mecA que codifica la PBP2a

<400> 2

ttattcatct atatcgtatt ttttattacc gttctcatat agctcatcat acactttacc 60
 tgagattttg gcattgtagc tagccattcc tttatcttgt acatctttaa cattaatagc 120

ES 2 773 920 T3

catcatcatg tttggattat ctttatcata tgatataaac cacccaatth gtctgccagt 180
 ttctccttgt ttcattttga gttctgcagt accggatttg ccaattaagt ttgcataaga 240
 tctataaata tcttctttat gtgttttatt tacgacttgt tgcataccat cagttaatag 300
 attgatattt tctttggaaa taatattttt cttccaaact ttgtttttcg tgtcttttaa 360
 taagtgaggt gcgttaatat tgccattatt ttctaatacg ctatagattg aaaggatctg 420
 tactgggtta atcagtattt caccttgtcc gtaacctgaa tcagctaata atatttcatt 480
 atctaaatth ttgtttgaaa tttgagcatt ataaaatgga taatcacttg gtatatcttc 540
 accaacacct agttttttca tgcctttttc aaatttctta ctgcctaatt cgagtgctac 600
 tctagcaaag aaaatgttat ctgatgattc tattgcttgt tttaaagtcga tattaccatt 660
 taccacttca tatcttgtaa cgttgtaacc accccaagat ttatcttttt gccaaccttt 720
 accatcgatt ttataacttg ttttatcgtc taatgttttg ttatttaacc caatcattgc 780
 tgttaatatt ttttgagttg aacctgggta agttgtaatc tggaaacttg tgagcagagg 840
 ttctttttta tcttcgggta atttattata ttcttcgta ctcatgccat acataaatgg 900
 atagacgtca tatgaaggtg tgcttacaag tgctaataat tcacctgttt gaggggtgat 960
 agcagtacct gagccataat catttttcat gttgttataa atactctttt gaacttttagc 1020
 atcaatagtt agttgaatat ctttgccatc tttttctttt ttctctatta atgtatgtgc 1080
 gattgtattg ctattatcgt caacgattgt gacacgatag ccatcttcat gttggagctt 1140
 tttatcgtaa agtttttcga gtcccttttt accaataact gcatcatctt tatagccttt 1200
 atattctttt tgttttaatt cttcagagtt aatgggacca acataaccta atagatgtga 1260
 agtcgctttt tctagaggat agttacgact ttctgtttca ttagttgtaa gatgaaatth 1320
 ttttgcgaaa tcaacttaat atccatccat ttttttaacg gttttaagtg gaacgaaggt 1380
 atcatcttgt acccaattht gatccatttg ttgtttgata tagtcttcag aaatacttag 1440
 ttcttttagcg attgctttat aatctttttt agatacattc tttggaacga tgcctatctc 1500
 atatgctggt cctgtattgg ccaattccac attgtttcgg tctaaaatth taccagttc 1560
 tgattttaaa ttttcaatat gtatgctttg gtctttctgc attcctggaa taatgacgct 1620
 atgatcccaa tctaacttcc acataccatc ttctttaaca aaattaaatt gaacgttgcg 1680
 atcaatgtta ccgtagtttg ttttaattht atattgagca tctactcgtt ttttatttht 1740
 agatacttht tttattttac gatcctgaat gtttataatc ttaacgccta aactattata 1800
 tattttttatc ggacgttcag tcatttctac ttcaccatta tcgcttttag aatataact 1860
 gctatcttht taaacttggt tgaaattht atcttcaatt gcatcaatag tattattaat 1920
 ttctttatct tttgaagcat aaaaatatat accaaacccg acaactacaa ctattaaaat 1980
 aagtgaaca atthttatct ttttcat 2007

<210> 3
 <211> 76
 <212> PRT

5

ES 2 773 920 T3

<213> *Staphylococcus aureus*

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <223> secuencia de aminoácidos del fragmento de PBP2a

<400> 3

Met Tyr Gly Met Ser Asn Glu Glu Tyr Asn Lys Leu Thr Glu Asp Lys
1 5 10 15

Lys Glu Pro Leu Leu Asn Lys Phe Gln Ile Thr Thr Ser Pro Gly Ser
20 25 30

Thr Gln Lys Ile Leu Thr Ala Met Ile Gly Leu Asn Asn Lys Thr Leu
35 40 45

Asp Asp Lys Thr Ser Tyr Lys Ile Asp Gly Lys Gly Trp Gln Lys Asp
50 55 60

Lys Ser Trp Gly Gly Tyr Asn Val Thr Arg Tyr Glu
65 70 75

10

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> secuencia de aminoácidos del centro activo da PBP2a

20

<400> 4

Ser Thr Gln Lys
1

25

<210> 5

<211> 228

<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 5

30

atgtatggca tgagcaacga agaataaac aaactgaccg aagataaaaa agaaccgctg 60
ctgaacaaat ttcagattac caccagcccg ggcagcacc agaaaattct gaccgcatg 120
attggcctga acaacaaaac cctggatgat aaaaccagct ataaaattga tggcaaaggc 180
tggcagaaag ataaaagctg gggcggtat aacgtgaccc gctatgaa 228

35

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<220>

<221> MISC_FEATURE

40

<223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera para CDR1

<400> 6

ES 2 773 920 T3

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Gly His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

5 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera para CDR2
 <400> 7

15 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

20 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena ligera para CDR3
 <400> 8

30 Phe Gln Gly Ser Tyr Val Pro Leu Thr
 1 5

35 <210> 9
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

40 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN de la cadena ligera para CDR1
 <400> 9
 cgcagcagcc agagcattgg ccatagcaac ggcaacacct atctggaa 48

45 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

50 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN de la cadena ligera para CDR2
 <400> 10
 aaagtgagca accgcttag c 21

55 <210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

60 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN de la cadena ligera para CDR3
 <400> 11
 ttcaggga gctatgtgcc gctgacc 27

ES 2 773 920 T3

<210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> *Staphylococcus aureus*

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena pesada para CDR1
 10
 <400> 12

 Gly Phe Ser Ile Thr Ser Ser Ser Ser Cys Trp His
 1 5 10

 15 <210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena pesada para CDR2

 <400> 13
 25
 Arg Ile Cys Tyr Glu Gly Ser Ile Ser Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

 <210> 14
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <223> secuencia de aminoácidos de la cadena pesada para CDR3

 <400> 14

 Glu Asn His Asp Trp Phe Phe Asp Val
 1 5
 40
 <210> 15
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN de la cadena pesada para CDR1

 <400> 15
 ggcttagca ttaccagcag cagcagctgc tggcat 36

 <210> 16
 <211> 48
 55 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

 <220>
 <221> misc_feature
 60 <223> secuencia de ADN de la cadena pesada para CDR2

 <400> 16

cgcatttgct atgaaggcag cattagctat agcccgagcc tgaaaagc 48

5 <210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN de la cadena pesada para CDR3

15 <400> 17
 gaaaaccatg attggtttt tgatgtg 27

20 <210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

25 <400> 18
 atggaagctt gctgggtcta caagctgtgg att 33

30 <210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

35 <400> 19
 atggaaatgg cagcctggtc ttattcctct 30

40 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

45 <400> 20
 gatgtgaagc tcaggagtc 20

50 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

55 <400> 21
 caggtgcagc tgaaggagtc 20

60 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

65 <400> 22
 caggtgcagc tgaagcagtc 20

70 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

75 <400> 23
 caggttactc tgaagagtc 20

80 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 24
 gaggtccagc tgcaacaatc t 21

5 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

10 <400> 25
 gaggtccagc tcagcagtc 20

15 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

20 <400> 26
 caggtccaac tcagcagcc t 21

25 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

30 <400> 27
 gaggtgaagc tggaggagtc 20

35 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

40 <400> 28
 gatgtgaact tggaagtgc 20

45 <210> 29
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

50 <400> 29
 tggacagga tccagagttc caggtcact 29

55 <210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

60 <400> 30
 gacattgtga tgaccagtc t 21

65 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 31
 gatgttttga tgacccaaac t 21

<210> 32
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 32

gatattgtga taaccag 18
 <210> 33
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 33
 10 gacattgtgc tgaccaatc t 21
 <210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 34
 gatattgtgc taactcagtc t 21
 <210> 35
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 35
 25 gatatccaga tgacacagac t 21
 <210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 36
 gacatccagc tgactcagtc t 21
 35 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 40 <400> 37
 caaattgttc tcaccagtc t 21
 <210> 38
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 38
 50 caggctgttg tgactcagga a 21
 <210> 39
 <211> 18
 <212> ADN
 55 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 39
 tacagttggt gcagcatc 18

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a la proteína PBP2a, caracterizado por que comprende, en la región variable de la cadena ligera, una región CDR1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6, una región CDR2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7 y una región CDR3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO:8, y, en la región variable de la cadena pesada, una región CDR1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12, una región CDR2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 13 y una región CDR3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO:14.
- 10 2. El anticuerpo monoclonal aislado de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que en la región variable de la cadena ligera, la región CDR1 está codificada por una secuencia que consiste en la SEQ ID NO:9, la región CDR2 está codificada por una secuencia que consiste en SEQ ID NO:10 y la región CDR3 está codificada por una secuencia que consiste en SEQ ID NO:11 y en la región variable de la cadena pesada, la región CDR1 está codificada por una secuencia que consiste en la SEQ ID NO:15, la región CDR2 está codificada por una secuencia que consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 16 y la región CDR3 está codificada por una secuencia que consiste en la SEQ ID NO:17.
- 15 3. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a la proteína PBP5 de *Enterococcus* spp., caracterizado por que comprende, en la región variable de la cadena ligera, una región CDR1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 6, una región CDR2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7 y una región CDR3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO:8, y, en la región variable de la cadena pesada, una región CDR1 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12, una región CDR2 que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 13 y una región CDR3 que consiste en la secuencia SEQ ID NO:14.
- 20 4. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que en la región variable de la cadena ligera, la región CDR1 está codificada por una secuencia que consiste en la SEQ ID NO:9, la región CDR2 está codificada por una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 10 y la región CDR3 está codificada por una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 11 y en la región variable de la cadena pesada, la región CDR1 está codificada por una secuencia que consiste en la SEQ ID NO:15, la región CDR2 está codificada por una secuencia que consiste en una secuencia de SEQ ID NO: 16 y la región CDR3 está codificada por una secuencia que consiste en la SEQ ID NO:17.
- 25 5. Un anticuerpo monoclonal aislado como se define en las reivindicaciones 1 a 4 para su uso como medicamento.
- 30 6. Un anticuerpo monoclonal aislado como se define en las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento o prevención de una infección por bacterias del filo Firmicutes.

FIG. 1

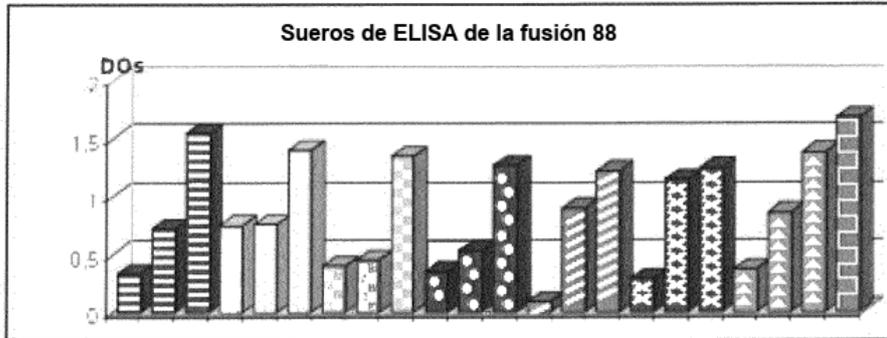


FIG. 2

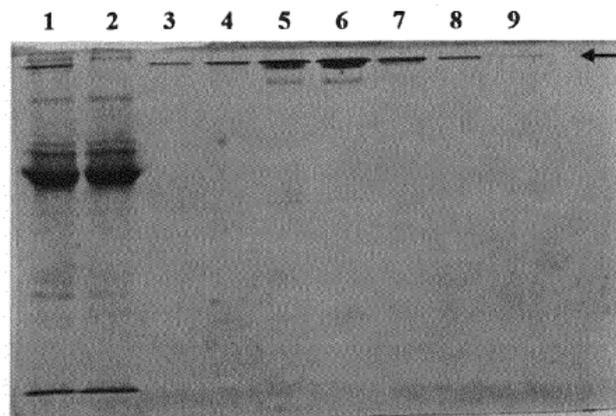


FIG. 3

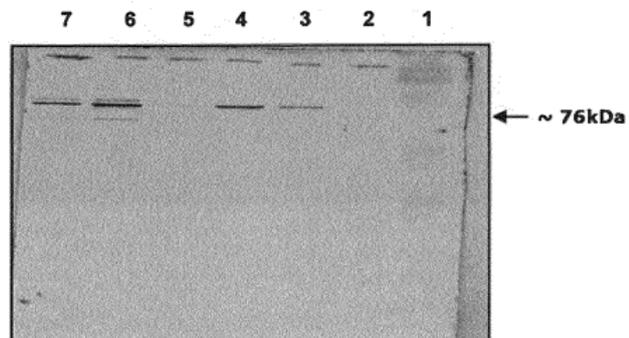


FIG. 4

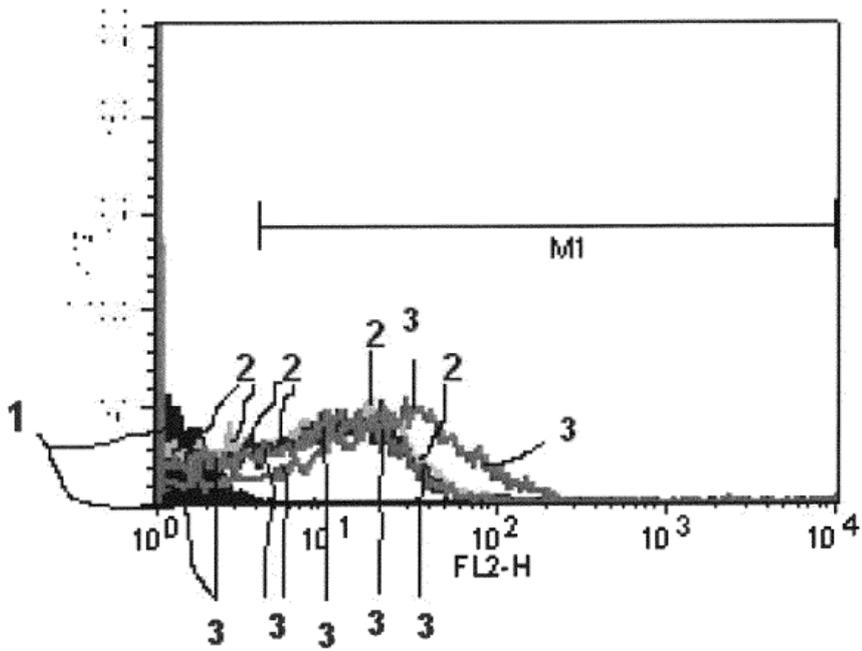


FIG. 5

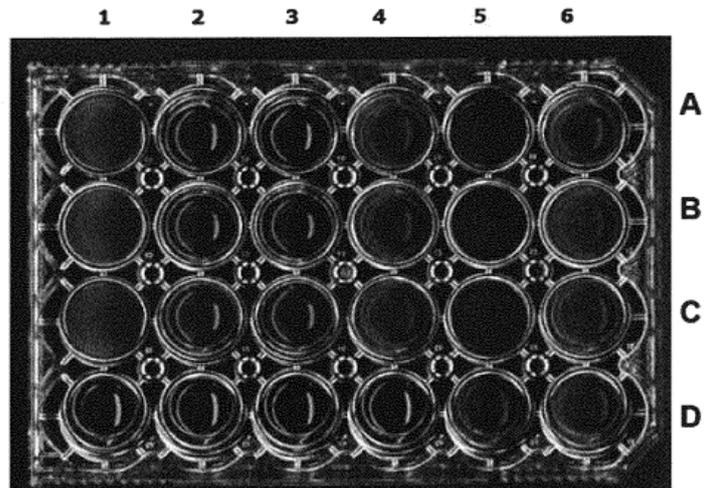


FIG. 6A

Cuantificación renal de CEB MRSA

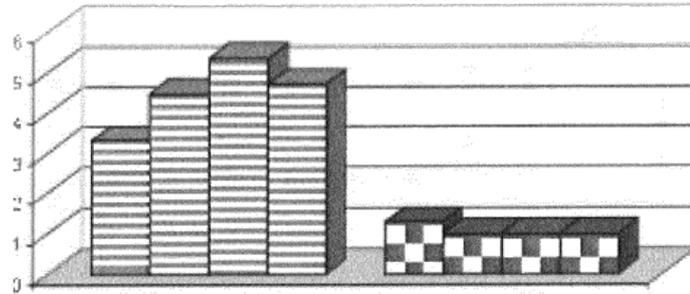


FIG. 6B

Cuantificación renal de MRSA ibérica

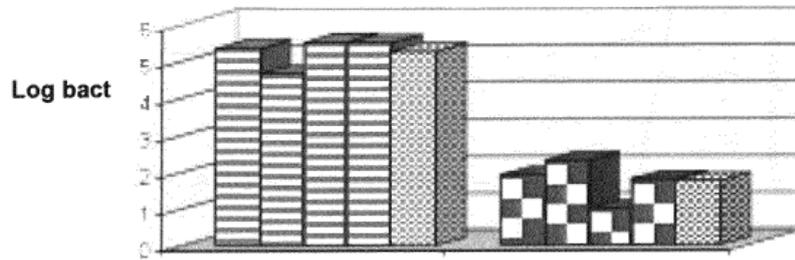


FIG. 6C

Cuantificación renal de CA-MRSA WB79

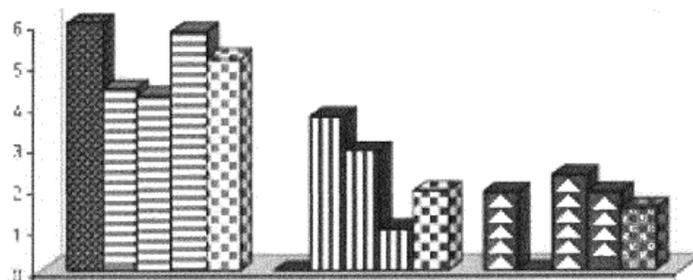


FIG. 7A

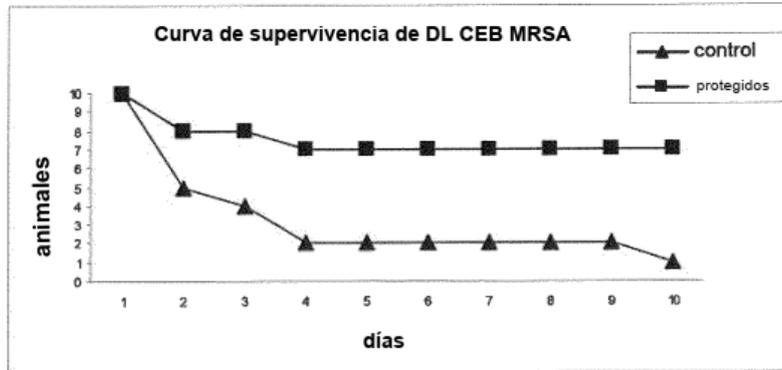


FIG. 7B

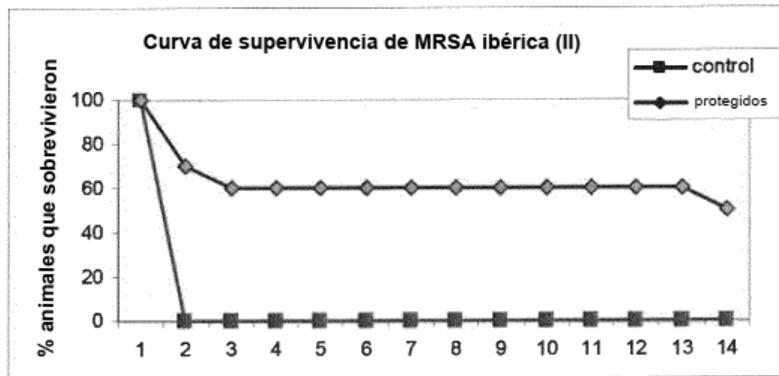


FIG. 7C

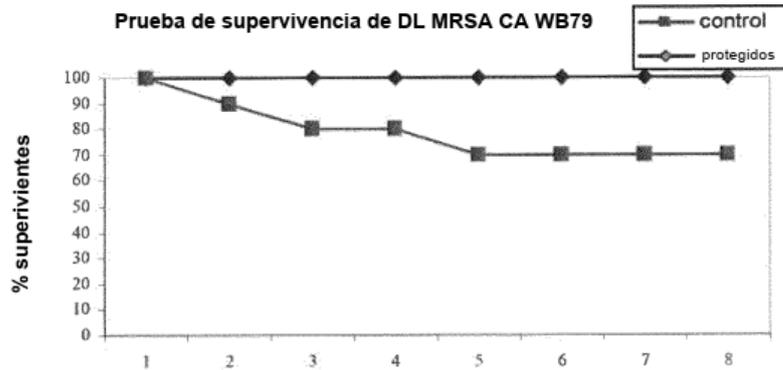


FIG. 8A

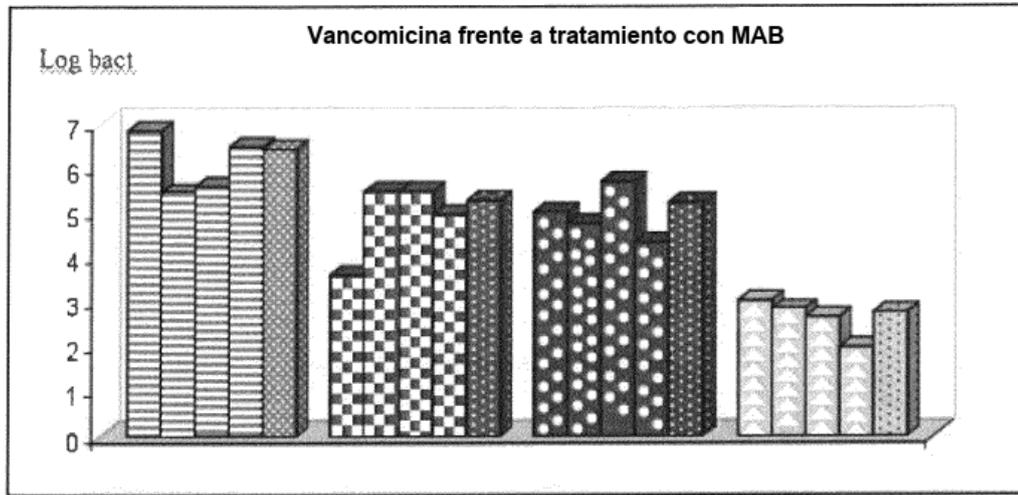


FIG. 8B

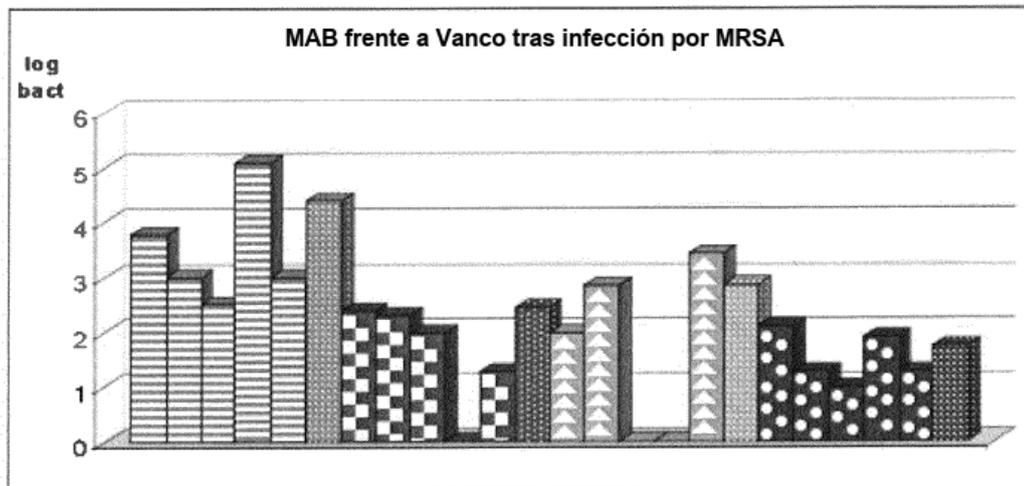


FIG. 9A

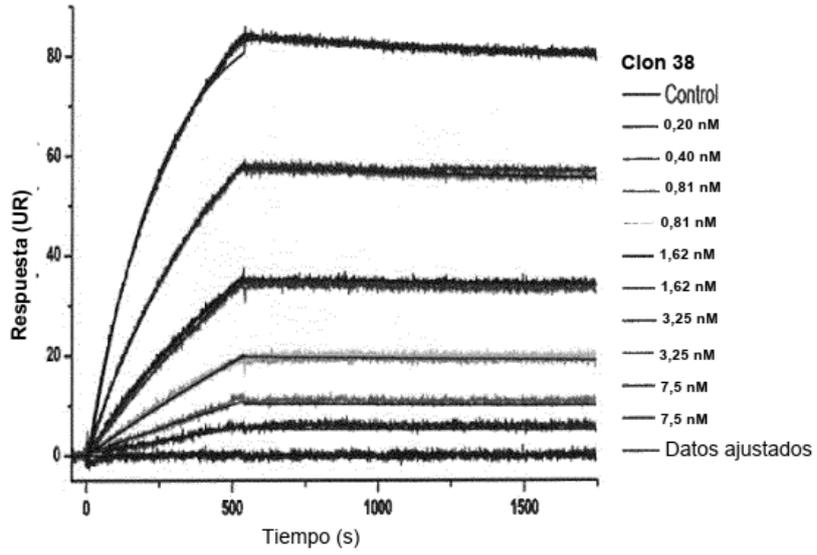


FIG.9B

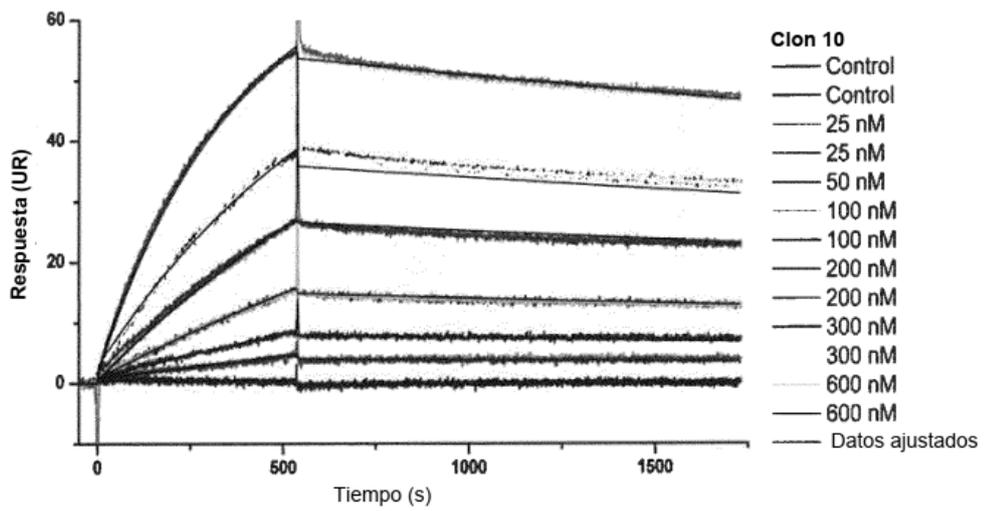


Fig. 10

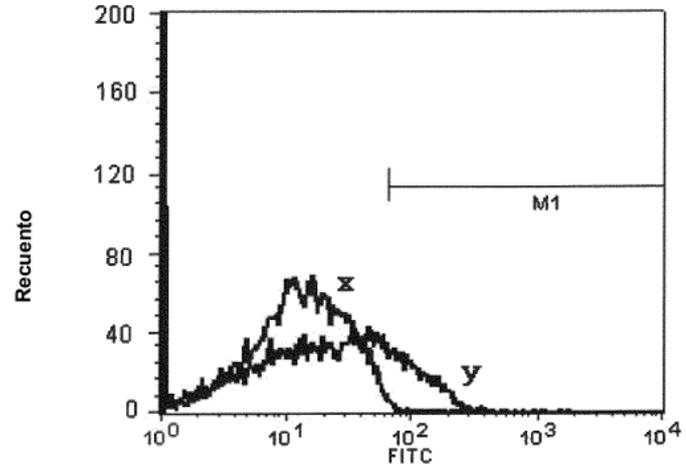


Fig. 11

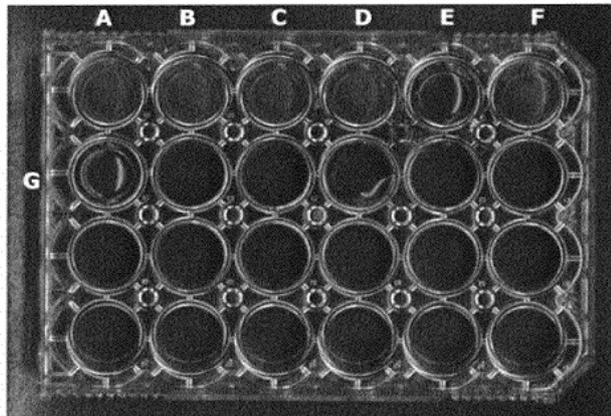


Fig 12

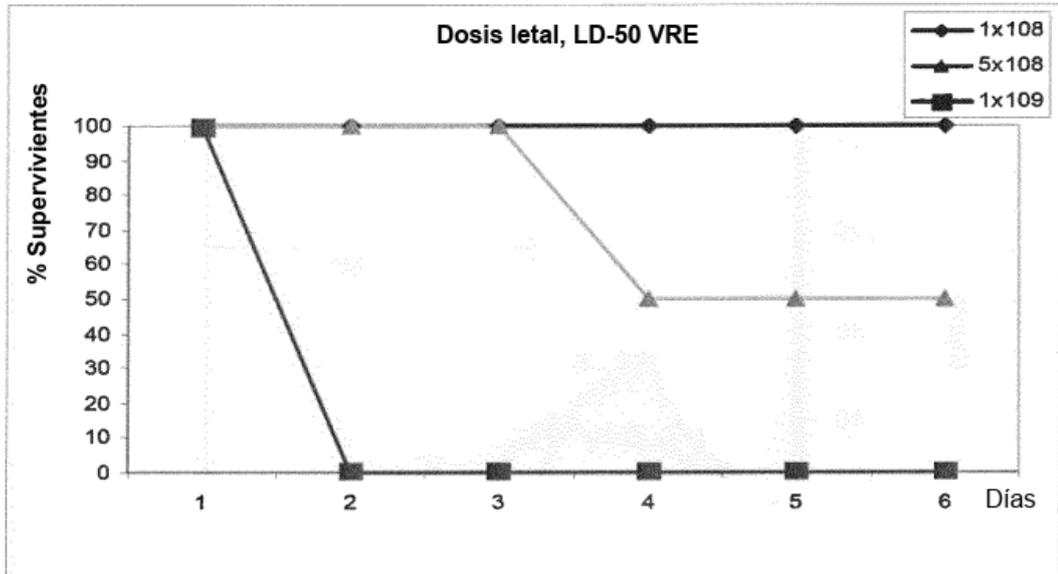


Fig. 13

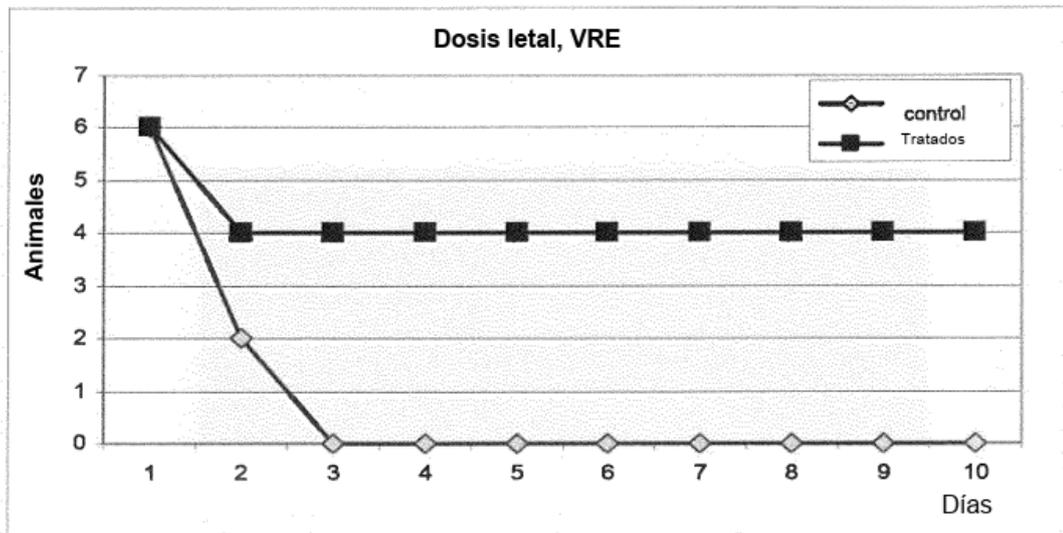


Fig. 14

