

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 252**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/40**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2015** **PCT/US2015/036576**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015** **WO15196011**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2015** **E 15809174 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024** **EP 3157565**

54 Título: **Tratamiento de las infecciones polibacterianas**

30 Prioridad:

**19.06.2014 US 201462014506 P**  
**31.03.2015 US 201562140849 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**22.10.2024**

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)**  
**One MedImmune Way**  
**Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**SELLMAN, BRET;**  
**HILLIARD, JAMESE, JOHNSON;**  
**JONES, OMARI y**  
**STOVER, CHARLES, KEN**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la  
Oficina Europea de Patentes

ES 2 983 252 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Tratamiento de las infecciones polibacterianas

## 5 CAMPO

La tecnología se refiere al uso de anticuerpos antibacterianos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos para el tratamiento y la prevención de infecciones, incluidas las infecciones polibacterianas.

## 10 ANTECEDENTES

Las infecciones oportunistas son infecciones que son más frecuentes y/o más graves como consecuencia de un entorno especialmente propicio, tal como un sistema inmunitario debilitado. Se presentan con frecuencia en pacientes hospitalizados y/o inmunodeprimidos. A menudo, las infecciones oportunistas son polimicrobianas, es decir, implican a múltiples agentes infecciosos. Dos bacterias oportunistas importantes son *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es una bacteria Gram-positiva, facultativamente aeróbica, que forma cocos agrupados y que suele colonizar la nariz y la piel de los seres humanos sanos. Aproximadamente el 20-30 % de la población es colonizada por *S. aureus* en un momento dado. Las barreras mucosa y epidérmica (piel) protegen normalmente contra las infecciones por *S. aureus*, pero las infecciones oportunistas por *S. aureus* pueden llegar a ser graves y causar diversas enfermedades o afecciones, entre las que se incluyen, a título de ejemplo no limitativo, bacteriemia, celulitis, infecciones de los párpados, intoxicación alimentaria, infecciones articulares, infecciones cutáneas, síndrome de la piel escaldada, síndrome de shock tóxico, neumonía, osteomielitis, endocarditis, meningitis y formación de abscesos.

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es una bacteria Gram negativa causante de infecciones agudas y crónicas. *P. aeruginosa* es una causa frecuente de infecciones hospitalarias en el mundo occidental. Es un agente causante frecuente de bacteriemia en víctimas de quemaduras e individuos inmunocomprometidos. También es la causa más común de neumonía nosocomial por Gram negativos, especialmente en pacientes con ventilación mecánica, y es el patógeno más prevalente en los pulmones de individuos con fibrosis quística.

Las infecciones por bacterias como *S. aureus* y *P. aeruginosa* se asocian a una mayor morbilidad y mortalidad, y es frecuente que *S. aureus* y *P. aeruginosa* se aislen del mismo paciente. En vista de ello, así como del hecho de que la multirresistencia está aumentando, se necesitan estrategias novedosas para prevenir y tratar las infecciones bacterianas, incluidas las polibacterianas.

## BREVE COMPENDIO

La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias VH y VL de los SEQ ID NOs: 45 y 46 para su uso en el tratamiento o prevención de una infección polibacteriana en un paciente, en el que la infección polibacteriana comprende *S. aureus* y al menos otra bacteria Gram negativa, cuyo crecimiento está potenciado por la toxina alfa de *S. aureus*.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento o diagnóstico se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia o para diagnóstico.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un antígeno de *S. aureus*, y el antígeno de *S. aureus* es la toxina alfa. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la toxina alfa de *S. aureus* se une al mismo epítipo de toxina alfa que un anticuerpo que comprende las secuencias VH y VL de los SEQ ID NOs: 45 y 46. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la toxina alfa de *S. aureus* es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende (a) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; (b) una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58; (c) una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59; (d) una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; (e) una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y (f) una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 56. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la toxina alfa de *S. aureus* comprende la VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de SEQ ID NOs: 57, 58, 59, 1, 2 y 56. La VH y la VL del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a *S. aureus* alfa comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 45 y 46.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la toxina alfa de *S. aureus* se une al mismo epítipo de toxina alfa que un anticuerpo que comprende las secuencias VH y VL de SEQ ID NOs: 45 y 46. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la toxina alfa de *S. aureus* comprende las secuencias VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 de SEQ ID NOs: 57, 58, 59, 1, 2 y

56, respectivamente. La VH y la VL del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a la toxina alfa de *S. aureus* comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs:45 y 46. En ciertos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la toxina alfa de *S. aureus* comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69.

En ciertos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno de *S. aureus* se administra durante dos o más ciclos de prevención o tratamiento.

En ciertos aspectos, los métodos proporcionados en el presente documento comprenden la administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno de *S. aureus* y la administración de un segundo agente antibacteriano.

La infección polibacteriana puede ser una infección ocular, una infección pulmonar, una infección por quemadura, una infección por herida, una infección por herida quirúrgica, una infección cutánea, una infección de tejidos blandos, una infección sanguínea, una infección ósea o una combinación de dos o más de dichas infecciones.

El paciente puede padecer neumonía aguda, quemaduras, infección corneal, fibrosis quística, neumonía asociada a ventilación mecánica, infección cutánea, infección de heridas o una combinación de ambas.

El paciente puede ser hospitalizado.

La administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno de *S. aureus*) puede dar lugar a los resultados mostrados en las Figuras 8-10 y descritos en los Ejemplos 3-4.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra la supervivencia de ratones inoculados con la cepa 6077 de *Pseudomonas aeruginosa* (**A**) o la cepa SF8300 de *Staphylococcus aureus* (**B**).

La **Figura 2A** muestra la supervivencia de ratones inoculados con *P. aeruginosa* ("PA 6077"), *S. aureus* ("SA SF8300") ("Infección combinada"). La **Figura 2B** muestra las unidades formadoras de colonias (CFU) de *P. aeruginosa* ("PA CFU") y *S. aureus* ("SA CFU") de los pulmones de ratones inoculados con *P. aeruginosa* y/o *S. aureus*.

La **Figura 3** muestra las CFU de *P. aeruginosa* ("recuentos PA") y *S. aureus* ("recuentos SA") medidas en ratones inoculados con *P. aeruginosa* ("PA"), *S. aureus* ("SA"), o ambos (SA+PA).

La **Figura 4** muestra las UFC por ml de homogeneizado pulmonar en ratones inoculados. Se inocularon ratones con *S. aureus* de tipo salvaje ("SA SF8300 WT") solo (círculos) o en combinación con *P. aeruginosa* ("PA 6077") (triángulos), donde se midieron los niveles de *S. aureus* a las 4, 8, 24 y 48 horas tras la inoculación. También se inocularon ratones con *P. aeruginosa* ("PA 6077") sola (cuadrados) o en combinación con *S. aureus* de tipo salvaje ("SA SF8300 WT"), donde se midieron los niveles de *P. aeruginosa* ("PA") a las 4, 8, 24 y 48 horas tras la inoculación.

La **Figura 5** muestra la supervivencia de ratones inoculados con *S. aureus* de tipo salvaje ("SA SF8300 WT"), *S. aureus* que contiene una delección en el gen que codifica para la toxina alfa ("SA SF8300  $\Delta$ hla"), *P. aeruginosa* ("PA 6077"), o una combinación de los mismos.

La **Figura 6A** muestra la supervivencia de los ratones que recibieron toxina alfa de *S. aureus* ("AT"), *P. aeruginosa* ("PA 6077"), *P. aeruginosa* en combinación con toxina alfa, o *P. aeruginosa* en combinación con toxina alfa y un anticuerpo anti-toxina alfa (LC10). La **Figura 6B** también muestra la supervivencia de los ratones que recibieron toxina alfa de *S. aureus* ("AT"), y *P. aeruginosa* ("PA 6077"), y también muestra la supervivencia de los ratones que recibieron *S. aureus* de tipo salvaje ("SA SF8300 WT"), *S. aureus* de tipo salvaje ("SA SF8300 WT") en combinación con *P. aeruginosa* ("PA 6077"), o *P. aeruginosa* ("PA 6077") con un sedimento celular obtenido a partir de *S. aureus* muerto por calor ("Células SA HK") o sobrenadante obtenido a partir de *S. aureus* muerto por calor ("SA HK SUP").

La **Figura 7** muestra el nivel de *P. aeruginosa* en ratones tratados con *P. aeruginosa* ("PA 6077") sola o en combinación con *S. aureus* de tipo salvaje ("SA SF8300 WT"), *S. aureus* que contiene una delección en el gen que codifica para la toxina alfa ("SA SF8300  $\Delta$ hla"), toxina alfa (AT), o tanto toxina alfa como el anticuerpo anti-toxina alfa LC10.

La **Figura 8** muestra la supervivencia de los ratones que recibieron un anticuerpo de control ("R347"), un anticuerpo contra la toxina alfa de *S. aureus* ("LC10"), un anticuerpo contra *P. aeruginosa* ("3902"), o una

combinación de un anticuerpo contra la toxina alfa de *S. aureus* ("LC10") y un anticuerpo contra *P. aeruginosa* ("3902"), y que luego fueron inoculados con *S. aureus* ("SA") y *P. aeruginosa* ("PA").

La **Figura 9** muestra la supervivencia de los ratones que recibieron una combinación de 15 mg/kg de anticuerpo contra la toxina alfa de *S. aureus* ("LC10") y 1 mg/kg de anticuerpo contra *P. aeruginosa* ("3902") o 15 mg/kg de anticuerpo de control ("R347") 48 horas antes, 24 horas antes o 1 hora después de la inoculación con *S. aureus* ("SA") y *P. aeruginosa* ("PA").

La **Figura 10** muestra los niveles de *S. aureus* ("SA CFU") y *P. aeruginosa* ("PA CFU") en ratones que recibieron 15 mg/kg de anticuerpo contra la toxina alfa de *S. aureus* ("LC10"), 1 mg/kg de anticuerpo contra *P. aeruginosa* ("3902") o 15 mg/kg de anticuerpo de control ("R347").

La **Figura 11(A)** muestra que LC10 reduce las CFU pulmonares y la diseminación. A) Grupos de ratones fueron inyectados con LC10 (□), o el control isotipo IgG (○) y desafiados intranasalmente 24 h después con 1e5 CFU de *Paeruginosa* y 5e7 CFU *S. aureus*, o *Paeruginosa* + AT. Se extrajeron pulmones y bazo en los momentos indicados para la determinación de CFU. **Figura 11(B)** Carga bacteriana de *S. aureus* en los bazo de los ratones mono (Sa) o coinfectados (Sa + Pa (Sa)) en los puntos temporales indicados tras la exposición intranasal descrita anteriormente. **Figura 11(C)** Número de *P. aeruginosa* recuperados de órganos distales a las 24 y 48 h en mono infección, coinfección y coinfección combinada con profilaxis utilizando LC10.

La **Figura 12** muestra que la  $\alpha$ -Toxina también potencia la virulencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii* en el modelo de infección pulmonar. A) Grupos de ratones fueron infectados por vía intranasal con *K. pneumoniae* 5e1 (■), *K. pneumoniae* 5e1 + *S. aureus* (5e7) (△), *K. pneumoniae* 5e1 + AT (●), *S. aureus* (△). Se controló la supervivencia durante 7 días B) Se inyectó LC10 (△) o IgG isotipo (A) a los animales y se les administró por vía intranasal 24 h después, como se ha descrito anteriormente, *K. pneumoniae* + *S. aureus*, o *K. pneumoniae* + AT LC10 (○) o IgG isotipo (●). Recuperación de CFU de los pulmones (C) y el bazo (D) 24 h después de la exposición. E) Se infectaron intranasalmente grupos de ratones con *A. baumannii* (8e5) (■), *A. baumannii* 8e5 + *S. aureus* (5e7) (△), *A. baumannii* 8e5 + AT (●), *S. aureus* (△). Se inyectó a los animales LC10 (△) o IgG isotipo (A) y se les administró por vía intranasal 24 h después *A. baumannii* + *S. aureus* o *A. baumannii* + AT LC10 (○) o IgG isotipo (●). Recuperación de CFU de los pulmones (F) y el bazo (G) 24 h después de la exposición.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

Cabe señalar que el término "una" o "un" entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, "un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo" se entiende que representa uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno del mismo. Por ello, las expresiones "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, polipéptido, péptido, carbohidrato, polinucleótido, lípido o combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y fragmentos Fv), mutantes Fv de cadena simple (scFv), anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación de antígeno de un anticuerpo, y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno, siempre que los anticuerpos presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), con base en la identidad de sus dominios constantes de cadena pesada a los que se refiere como alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las distintas clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas como toxinas, radioisótopos, etc.

El término "fragmento de anticuerpo" se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen, entre otros, fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea de anticuerpos que participan en el reconocimiento y la unión altamente específicos a un único determinante antigénico o epitopo. Esto contrasta con los anticuerpos policlonales que suelen incluir diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos.

El término "anticuerpo monoclonal" abarca tanto los anticuerpos monoclonales intactos y de longitud completa como los fragmentos de anticuerpos (como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), los mutantes monocatenarios (scFv), las proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a dichos anticuerpos fabricados de cualquier manera, incluyendo, pero sin limitación, por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo derivado de una inmunoglobulina no humana (*por ejemplo*, murina), que ha sido diseñado para contener secuencias mínimas no humanas (*por ejemplo*, murinas). Normalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las que los residuos de la región determinante complementaria (CDR) se sustituyen por residuos de la CDR de una especie no humana (*por ejemplo*, ratón, rata, conejo o hámster) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones et al, 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al, 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen et al, 1988, Science, 239:1534-1536). En algunos casos, los residuos de la región marco Fv (FW) de una inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos correspondientes de un anticuerpo de una especie no humana que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

El anticuerpo humanizado puede modificarse aún más mediante la sustitución de residuos adicionales, ya sea en la región marco Fv y/o dentro de los residuos no humanos sustituidos, para refinar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región o dominio (Fc) constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Algunos ejemplos de métodos utilizados para generar anticuerpos humanizados se describen en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.225.539 o 5.639.641.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de cadena ligera del anticuerpo o la región variable de cadena pesada del anticuerpo, ya sea solo o en combinación. Las regiones variables de cadena pesada y ligera consisten en cuatro regiones marco (FW) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FW y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque con base en la variabilidad de secuencias entre especies (*es decir*, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); y (2) un enfoque con base en estudios cristalográficos de antígeno-anticuerpo complejos (Al-lazikani et al. (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). Además, en la técnica se utilizan a veces combinaciones de estas dos estrategias para determinar las CDR.

El sistema de numeración de Kabat se utiliza generalmente cuando se refiere a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (*por ejemplo*, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

La numeración de la posición de los aminoácidos como en Kabat, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de la cadena pesada o los dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o más correspondientes a un acortamiento o inserción en una FW o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un único aminoácido insertado (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (*por ejemplo*, residuos 82a, 82b y 82c, *etc.* según Kabat) después del residuo 82 de FW de cadena pesada.

Tabla 1

Bucle	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
		(Numeración de Kabat)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32

Bucle	Kabat	AbM	Chothia
		(Numeración de Chothia)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar". Chothia se refiere en cambio a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901–917 (1987)). El final del bucle de CDR-H1 de Chothia cuando se numera utilizando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat sitúa las inserciones en H35A y H35B; si no están presentes ni 35A ni 35B, el bucle termina en 32; si solo está presente 35A, el bucle termina en 33; si están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizadas por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular.

Tal como se utiliza en el presente documento, la región Fc incluye los polipéptidos que comprenden la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante. Así, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y a los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, así como a la bisagra flexible N-terminal a estos dominios. Para IgA e IgM Fc puede incluir la cadena J. Para la IgG, el Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la bisagra entre Cgamma1 (Cy1) y Cgamma2 (Cy2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define generalmente para comprender los restos C226 o P230 en su extremo carboxilo, en donde la numeración es según el índice de EU establecido en Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Fc puede referirse a esta región de forma aislada, o esta región en el contexto de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión de Fc. Se han observado polimorfismos en varias posiciones de Fc diferentes, incluyendo, pero sin limitarse a, las posiciones 270, 272, 312, 315, 356 y 358 numeradas por el índice de UE y, por tanto, pueden existir ligeras diferencias entre la secuencia presentada y las secuencias de la técnica anterior.

La expresión "anticuerpo humano" significa un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un ser humano realizado mediante cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos, y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido humano de cadena pesada y/o ligera como, por ejemplo, un anticuerpo que comprenda polipéptidos murinos de cadena ligera y de cadena pesada humana.

La expresión "anticuerpos quiméricos" se refiere a los anticuerpos en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina procede de dos o más especies. Normalmente, la región variable de las cadenas ligeras y pesadas corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (*por ejemplo*, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra (normalmente humana) para evitar provocar una respuesta inmunitaria en esa especie.

La "afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (*por ejemplo*, un anticuerpo) y su pareja de unión (*por ejemplo*, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de una pareja de unión (*por ejemplo*, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañera Y puede representarse generalmente por la constante de disociación ( $K_D$ ). La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, incluidos los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad se unen generalmente al antígeno de forma lenta y tienden a disociarse con facilidad, mientras que los anticuerpos de alta afinidad se unen generalmente al antígeno de forma más rápida y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. En la técnica se conocen diversos métodos para medir la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede utilizarse para los fines de la presente divulgación.

El término "anticuerpo biespecífico", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que tiene sitios de unión para dos antígenos diferentes dentro de una única molécula de anticuerpo. Se apreciará que otras moléculas además de la estructura canónica del anticuerpo pueden construirse con dos especificidades de unión. Se apreciará además que la unión al antígeno por anticuerpos biespecíficos puede ser simultánea o secuencial. Los triomas y los hibridomas híbridos son dos ejemplos de líneas celulares que pueden secretar anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos también pueden construirse por medios recombinantes.

Por "se une específicamente" se entiende generalmente que un anticuerpo se une a un epítipo a través de su dominio de unión al antígeno, y que la unión implica cierta complementariedad entre el dominio de unión al antígeno y el epítipo. De conformidad con esta definición, se dice que un anticuerpo se "une específicamente" a un epítipo cuando se une a ese epítipo, a través de su dominio de unión al antígeno con más facilidad de la que se uniría a un epítipo aleatorio no relacionado. El término "especificidad" se utiliza en el presente documento para calificar la afinidad relativa por la que un determinado anticuerpo se une a un determinado epítipo. Por ejemplo, puede considerarse que el anticuerpo "A" tiene una especificidad mayor para un epítipo dado que el anticuerpo "B", o puede decirse que el anticuerpo "A" se une al epítipo "C" con una especificidad mayor que la que tiene para el epítipo relacionado "D".

Por "se une preferentemente" se entiende que el anticuerpo se une específicamente a un epítipo más fácilmente de lo que se uniría un epítipo relacionado, similar, homólogo o análogo. Así, un anticuerpo que "se une preferentemente" a un epítipo determinado se uniría con mayor probabilidad a ese epítipo que a otro epítipo relacionado, aunque dicho anticuerpo pueda presentar una reacción cruzada con el epítipo relacionado.

Se dice que un anticuerpo "inhibe competitivamente" la unión de un anticuerpo de referencia a un epítipo dado si se une preferentemente a ese epítipo hasta el punto de bloquear, en cierta medida, la unión del anticuerpo de referencia al epítipo. La inhibición competitiva se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayos ELISA de competencia. Puede decirse que un anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo de referencia a un epítipo dado en al menos un 90 %, al menos un 80 %, al menos un 70 %, al menos un 60 % o al menos un 50 %.

El término mutaciones "YTE" se refiere a una combinación de las tres mutaciones, M252Y, S254T y T256E, en el que la numeración es de conformidad con el índice UE según se establece en Kabat, introducidas en la cadena pesada de una IgG. Véase la patente Estadounidense nº 7.658.921.

Términos tales como "tratar" o "tratamiento" o "a tratar" o "aliviar" o "a aliviar" se refieren a medidas terapéuticas que curan, ralentizan, atenúan los síntomas y/o detienen la progresión de una afección o trastorno patológico diagnosticado, por ejemplo, una infección. Así pues, entre las personas que necesitan tratamiento se incluyen las que ya han sido diagnosticadas o se sospecha que padecen el trastorno. Un sujeto puede ser "tratado" con éxito de una infección microbiana de conformidad con los métodos de la presente divulgación si el paciente muestra uno o más de los siguientes: una reducción de los síntomas de la infección microbiana, una reducción de la cantidad o una ausencia completa del microbio en el paciente (por ejemplo, según se evalúa utilizando una muestra obtenida del paciente), una reducción en la cantidad o ausencia completa de un indicador del microbio (por ejemplo, toxina alfa de *S. aureus*) en el paciente, y/o una reducción en la gravedad y/o frecuencia de un síntoma o síntomas de la infección.

Las medidas profilácticas o preventivas se refieren a aquellas que evitan y/o ralentizan el desarrollo de una afección o trastorno patológico diana, por ejemplo, una infección. Así pues, entre las personas que necesitan medidas profilácticas o preventivas se encuentran las propensas a padecer el trastorno y aquellas en las que se desea prevenirlo.

El término "formulación farmacéutica" "composición farmacéutica" se refiere a un preparado cuya forma permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. La formulación puede ser estéril.

Una "cantidad eficaz" de un anticuerpo o inmunoconjugado, tal como se divulga en el presente documento, es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente establecido. Una "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente y de una manera rutinaria, en relación con el fin indicado.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

#### **Anticuerpos anti-*Staphylococcus* y fragmentos de unión a antígeno de los mismos**

En ciertos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de conformidad con los métodos proporcionados en el presente documento se une específicamente a un antígeno de *Staphylococcus* (por ejemplo, polipéptido y/o carbohidrato).

En ciertos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un antígeno de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, polipéptido y/o carbohidrato). *S. aureus* expresa varios factores de virulencia, como polisacáridos capsulares y toxinas proteicas. Un factor de virulencia a menudo asociado con la infección por *S. aureus* que es el principal agente citotóxico es la toxina alfa (también conocida como alfa-hemolisina o Hla), una exoproteína hemolítica y formadora de poros producida por la mayoría de las cepas patógenas de *S. aureus*. La toxina forma poros heptaméricos en las membranas de células susceptibles tales como glóbulos blancos, plaquetas, eritrocitos, monocitos de sangre periférica, macrófagos, queratinocitos, fibroblastos y

células endoteliales. La formación de poros de toxina alfa suele provocar disfunción o lisis celular. Por consiguiente, en ciertos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a la toxina alfa de *Staphylococcus aureus*. En ciertos aspectos, la toxina alfa de *S. aureus* comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:70.

5

Tabla 2: Secuencia del anticuerpo anti-toxina alfa SEQ ID Nos

Anticuerpo	VL	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	VH	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
LC10	46	1	2	56	45	57	58	59

10 El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la toxina alfa de *S. aureus* se une al mismo epítipo de toxina alfa que un anticuerpo que comprende las secuencias de región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL) de; SEQ ID NOs:45 y 46; El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la toxina alfa de *S. aureus* se une al mismo epítipo de toxina alfa que un anticuerpo que comprende las secuencias VH y VL de SEQ ID NOs:45 y 46.

15

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la toxina alfa de *S. aureus* inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo que comprende las secuencias VH y VL de las SEQ ID NOs:45 y 46 a la toxina alfa de *S. aureus*. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la toxina alfa de *S. aureus* inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo que comprende las secuencias VH y VL de las SEQ ID NOs:45 y 46 a la toxina alfa de *S. aureus*.

20

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la toxina alfa de *S. aureus* es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende (a) una VH CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:57; (b) una VH CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; (c) una VH CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:59; (d) una VL CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1; (e) una VL CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2; y (f) una VL CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:56.

25

30 Las VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs:57, 58, 59, 1, 2 y 56. Los VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3 corresponden a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs:57, 58, 59, 1, 2 y 56.

30

La VH y la VL comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs:45 y 46. VH y VL corresponden a las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs:45 y 46.

35

En ciertos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la toxina alfa de *S. aureus* comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:68 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:69 (es decir, MEDI4893).

40

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la toxina alfa de *S. aureus* puede unirse a un fragmento de la toxina alfa de *S. aureus* de la SEQ ID NO:70 que comprende (a) los aminoácidos 261-272 de la SEQ ID NO:70; (b) los aminoácidos 173-201 de la SEQ ID NO:70; (c) los aminoácidos 261-272 de la SEQ ID NO:70 y los aminoácidos 173-201 de la SEQ ID NO:70; o (d) los aminoácidos 248-277 de la SEQ ID NO:70. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la toxina alfa de *S. aureus* puede unirse a un fragmento de la toxina alfa de *S. aureus* de la SEQ ID NO:70 que consiste en (a) los aminoácidos 261-272 de la SEQ ID NO:70; (b) los aminoácidos 173-201 de la SEQ ID NO:70; (c) los aminoácidos 261-272 de la SEQ ID NO:70 y los aminoácidos 173-201 de la SEQ ID NO:70; o (d) los aminoácidos 248-277 de la SEQ ID NO:70.

45

50

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la toxina alfa de *S. aureus* puede (a) tener una constante de afinidad ( $K_D$ ) para la toxina alfa de aproximadamente 13 nM o menos; (b) se une a monómeros de toxina alfa, pero no inhibe la unión de toxina alfa al receptor de toxina alfa; (c) inhibe la formación de oligómeros de toxina alfa en al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 %; (d) reduce la actividad citolítica de toxina alfa en al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 % (por ejemplo, (e) reduce la infiltración celular y la liberación de citocinas proinflamatorias; o (f) una combinación de los mismos.

55

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como se describe en el presente documento, puede unirse específicamente a un epítipo de *S. aureus* (por ejemplo, toxina alfa) con una afinidad caracterizada por una constante de disociación ( $K_D$ ) no mayor que  $5 \times 10^{-2}$  M,  $10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M,  $10^{-4}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M,  $10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-6}$  M,  $10^{-6}$  M,  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-7}$  M,  $5 \times 10^{-8}$  M,  $10^{-8}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M,  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-10}$  M,  $10^{-10}$  M,  $5 \times 10^{-11}$  M,  $10^{-11}$  M,  $5 \times 10^{-12}$  M,  $10^{-12}$  M,  $5 \times 10^{-13}$  M,  $10^{-13}$  M,  $5 \times 10^{-14}$  M,  $10^{-14}$  M,  $5 \times 10^{-15}$  M, o  $10^{-15}$  M.

60



Un anticuerpo anti-toxina alfa o un fragmento de unión a antígeno puede alterar las propiedades biológicas de la toxina alfa, de las células que expresan toxina alfa o de otras células bacterianas. Un anticuerpo anti-toxina alfa o un fragmento de unión a antígeno puede neutralizar la actividad biológica de la toxina alfa uniéndose al polipéptido e inhibiendo la unión de los monómeros de toxina alfa en un poro transmembrana (por ejemplo, heptámero de toxina alfa). Los ensayos de neutralización pueden realizarse mediante métodos conocidos en la técnica utilizando, en algunas circunstancias, reactivos disponibles comercialmente. La neutralización de la toxina alfa a menudo se mide con un IC50 de  $1 \times 10^{-6}$  M o menos,  $1 \times 10^{-7}$  M o menos,  $1 \times 10^{-8}$  M o menos,  $1 \times 10^{-9}$  M o menos,  $1 \times 10^{-10}$  M o menos y  $1 \times 10^{-11}$  M o menos. Un anticuerpo o fragmento anti-toxina alfa puede neutralizar la capacidad de la toxina alfa para oligomerizarse y formar un poro transmembrana. El término "concentración inhibitoria 50 %" (abreviado como "IC50") representa la concentración de un inhibidor (por ejemplo, un anticuerpo anti-toxina alfa o un fragmento proporcionado en el presente documento) que se requiere para inhibir en un 50 % una actividad dada de la molécula diana del inhibidor (por ejemplo, la oligomerización de la toxina alfa para formar un complejo heptámero de poro transmembrana). Un valor IC50 más bajo corresponde generalmente a un inhibidor más potente.

Un anticuerpo o fragmento anti-toxina alfa puede inhibir una o más actividades biológicas de la toxina alfa. El término "inhibición", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier disminución estadísticamente significativa de la actividad biológica, incluido el bloqueo total de la actividad. Por ejemplo, "inhibición" puede referirse a una disminución de aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la actividad biológica. Un anticuerpo o fragmento anti-toxina alfa puede inhibir una o más actividades biológicas de la toxina alfa en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %.

Un anticuerpo o fragmento anti-toxina alfa puede eliminar la toxina alfa secretada por el *S. aureus* patógeno. Un anticuerpo o fragmento anti-toxina alfa puede lograr al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o aproximadamente un 100 % de depleción de la toxina alfa secretada por *S. aureus*.

Un anticuerpo o fragmento anti-toxina alfa puede inhibir la actividad de la toxina alfa estimulada in vitro (por ejemplo, unión al receptor, oligomerización) y/o la proliferación de células que expresan o secretan toxina alfa. Un anticuerpo o fragmento anti-toxina alfa a veces inhibe in vitro la actividad de la toxina alfa, la patogenicidad de *S. aureus* en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 % o al menos un 75 %. Los métodos para medir la proliferación celular, la patogenicidad y la actividad de la hemolisina alfa son conocidos en la técnica.

Un anticuerpo anti-toxina alfa o fragmento de unión a antígeno puede inhibir la expresión de uno o más genes inducibles que responden directa o indirectamente al entorno creado por la infección por *S. aureus* y/o la expresión y función de la toxina alfa. Un anticuerpo anti-toxina alfa o un fragmento de unión a antígeno puede inhibir la expresión de uno o más genes inducibles que responden directa o indirectamente al entorno creado por la infección por *S. aureus* y/o la expresión y función de la toxina alfa en al menos un 20 %, en al menos un 30 %, en al menos un 40 %, en al menos un 50 %, en al menos un 60 %, en al menos un 70 %, en al menos un 80 %, en al menos un 90 %, en al menos un 100 %, en al menos un 120 %, en al menos un 140 %, en al menos un 160 %, en al menos un 180 %, o en al menos un 200 %.

#### **Composiciones farmacéuticas**

En ciertas realizaciones, un anticuerpo *anti-Staphylococcus* o fragmento de unión a antígeno proporcionado en el presente documento puede formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable como composiciones farmacéuticas (terapéuticas), y puede administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. La vía y/o el modo de administración pueden variar en función de los resultados deseados. Tal como se utilizan en el presente documento, las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo *anti-Staphylococcus* o un fragmento de unión a antígeno se refieren a formulaciones de la tecnología. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa uno o más materiales no tóxicos que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos. Estos preparados contienen habitualmente sales, agentes tamponadores, conservantes, soportes compatibles y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos. Tales preparados farmacéuticamente aceptables también contienen habitualmente cargas sólidas o líquidas compatibles, diluyentes o sustancias encapsulantes que son adecuadas para su administración a un ser humano. El término "vehículo" designa un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el principio activo para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas también pueden mezclarse con los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígenos de la presente tecnología, y entre sí, de tal manera que no se produzca ninguna interacción que afecte sustancialmente a la eficacia farmacéutica deseada.

Las composiciones terapéuticas de la presente tecnología pueden formularse para una dosificación particular. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación.

terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y uniformizar la dosificación. La forma de dosificación unitaria, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas, adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

Las composiciones terapéuticas de la presente tecnología pueden formularse para vías de administración particulares, tales como la administración oral, nasal, pulmonar, tópica (incluidas la bucal y la sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquier método conocido en el arte de la farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación variará en función del sujeto tratado y del modo de administración concreto. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación será generalmente aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico.

### **Métodos de tratamiento y prevención**

La invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias VH y VL de los SEQ ID NOs: 45 y 46 para su uso en el tratamiento o prevención de una infección polibacteriana en un paciente, en el que la infección polibacteriana comprende *S. aureus* y al menos otra bacteria Gram negativa, cuyo crecimiento está potenciado por la toxina alfa de *S. aureus*. La administración del anticuerpo *anti-S. aureus* o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo anti-alfa toxina o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede inhibir el crecimiento de al menos otra bacteria. La administración del anticuerpo *anti-Saureus* o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo anti-alfa toxina o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede aumentar la supervivencia. La administración del anticuerpo *anti-Saureus* o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo anti-alfa toxina o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede disminuir la mortalidad.

El número de unidades formadoras de colonias (CFU) en una muestra obtenida de un paciente con una infección polibacteriana puede proporcionar una indicación de la gravedad de la infección. La administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, toxina alfa) puede disminuir las CFU de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*) en una muestra obtenida de un paciente en al menos un 50 %. La administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, toxina alfa) puede disminuir las CFU de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*) en una muestra obtenida de un paciente en al menos un 75 %. La administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, toxina alfa) puede disminuir las CFU de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*) en una muestra obtenida de un paciente en al menos un 80 %. La administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, toxina alfa) puede disminuir las CFU de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*) en una muestra obtenida de un paciente en al menos un 85 %. La administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, toxina alfa) puede disminuir las CFU de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*) en una muestra obtenida de un paciente en al menos un 90 %. La administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, toxina alfa) puede disminuir las CFU de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*) en una muestra obtenida de un paciente en al menos un 95 %. La administración de un anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno del mismo que sea específico de un antígeno de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, toxina alfa) puede disminuir las CFU de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*) en una muestra obtenida de un paciente en al menos un 96 %. La administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, toxina alfa) puede disminuir las CFU de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*) en una muestra obtenida de un paciente en al menos un 97 %. La administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, toxina alfa) puede disminuir las CFU de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*) en una muestra obtenida de un paciente en al menos un 98 %. La administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, toxina alfa) puede disminuir las CFU de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*) en una muestra obtenida de un paciente en al menos un 99 %. La administración de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno de *Staphylococcus aureus* (por ejemplo, toxina alfa) puede eliminar CFU de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*) en una muestra obtenida de un paciente.

La infección polibacteriana puede ser una infección ocular, una infección pulmonar, una infección por quemadura, una infección por herida, una infección por herida quirúrgica, una infección cutánea, una infección de tejidos blandos, una infección sanguínea, una infección ósea o una combinación de dos o más de dichas infecciones.

El paciente puede padecer neumonía aguda, quemaduras, infección corneal, fibrosis quística, neumonía asociada a ventilación mecánica, infección cutánea, infección de heridas o una combinación de ambas.

Los métodos de preparación y administración de anticuerpos antibacterianos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, anti-*Staphylococcus*, anti-*S. aureus*, anti-toxina alfa, anti-*Pseudomonas*, anti-*P. aeruginosa*, anti-Psl, anti-PcrV, o anticuerpos anti-Psl y PcrV, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) son bien conocidos o pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica. La vía de administración de los anticuerpos antibacterianos o de sus fragmentos de unión a antígenos puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral utilizado en el presente documento incluye, por ejemplo, la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea. Una forma adecuada de administración sería una solución inyectable, en particular para inyección o goteo intravenoso o intraarterial. Sin embargo, en otros métodos compatibles con lo expuesto en el presente documento, los anticuerpos antibacterianos o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden administrarse directamente en el lugar de la población celular adversa, por ejemplo, la infección, aumentando así la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico. Por ejemplo, los anticuerpos antibacterianos o el fragmento de unión a antígeno de los mismos pueden administrarse directamente en tejido ocular, lesiones por quemaduras o tejido pulmonar.

Los anticuerpos antibacterianos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos (por ejemplo, anticuerpos anti-*Staphylococcus*, anti-*S. aureus*, anti-toxina alfa, anti-*Pseudomonas*, anti-*P. aeruginosa*, anti-Psl, anti-PcrV, o anticuerpos anti-Psl y PcrV, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) pueden administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de infecciones polibacterianas (por ejemplo, infecciones que comprenden bacterias *Staphylococcus* y/o *Pseudomonas*). A este respecto, se apreciará que los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos están formulados para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo.

Los anticuerpos antibacterianos o sus fragmentos de unión a antígenos (por ejemplo, la toxina antialfa o sus fragmentos de unión a antígenos) pueden utilizarse en combinación con otros agentes antibacterianos tales como antibióticos. Entre los antibióticos se incluyen, por ejemplo, los betalactámicos (tal como la cefalexina), las sulfamidas (como el cotrimoxazol/trimetoprima-sulfametoxazol), las tetraciclinas (como la doxiciclina y la minociclina), clindamicina, vancomicina, linezolid, daptomicina, teicoplanina, quinupristina/dalfopristina (sinercid), tigeciclina, ciprofloxacino, meropenem, tobramicina y aztreonam. En ciertas realizaciones, el antibiótico es ciprofloxacino.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: *Staphylococcus aureus* potencia la infección por *Pseudomonas aeruginosa*

Se inoculó a ratones la cepa 6077 de *Pseudomonas aeruginosa* o la cepa SF8300 de *Staphylococcus aureus* y se evaluó su supervivencia. Se anestesió brevemente a ratones (n=10) con isoflurano/O<sub>2</sub> al 3 % y se depositaron 50 µl de bacterias (a distintas concentraciones) en la punta de las fosas nasales. La mortalidad se controló durante siete días. Como se muestra en la Figura 1A, todos los ratones tratados con 7.5e4 unidades formadoras de colonias (CFU) de *P. aeruginosa* sobrevivieron durante el periodo de siete días, pero ningún ratón tratado con 8.00e5 CFU sobrevivió. Además, todos los ratones tratados con 1.25e8 CFU de *S. aureus* sobrevivieron durante el periodo de siete días, pero ningún ratón tratado con 2.25e8 o 3.25e8 CFU de *S. aureus* sobrevivió (Figura 1B).

Para investigar la cinética de la coinfección, se inoculó en ratones una mezcla de *P. aeruginosa* y *S. aureus* a una concentración final de 5.5e7 CFU por ratón de *S. aureus* y 1.1e5 CFU por ratón de *P. aeruginosa*. La mortalidad se controló durante siete días. Como se muestra en la Figura 1, estas dosis estaban muy por debajo de las dosis letales cuando se administraban individualmente. Por lo tanto, la mayoría de los ratones tratados con *P. aeruginosa* o *S. aureus* sobrevivieron (Figura 2A). Sin embargo, ninguno de los ratones tratados con la combinación sobrevivió (Figura 2A).

También se examinó la colonización de *P. aeruginosa* y *S. aureus* en los ratones. En estos experimentos, los ratones fueron inoculados con una combinación de *P. aeruginosa* y *S. aureus* como se ha descrito anteriormente, y cinco ratones/grupo fueron eutanasiados en distintos momentos. Se les extrajeron los pulmones y, tras homogeneizarlos en 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS), se sembraron alicuotas en agar manitol-sal para cuantificar *S. aureus* o en agar de aislamiento de pseudomonas para cuantificar *P. aeruginosa*. Los niveles de *P. aeruginosa* fueron significativamente mayores en los ratones inoculados tanto con *P. aeruginosa* como con *S. aureus* que en los inoculados sólo con *P. aeruginosa* (Figura 2B). Además, los niveles de *P. aeruginosa* fueron significativamente superiores en los ratones inoculados con *P. aeruginosa* y *S. aureus* que en los inoculados sólo con *P. aeruginosa* tanto a las 24 horas como a las 36 horas tras la inoculación (Figura 3). En un experimento adicional, también se examinó la colonización en ratones inoculados con 6.1e7 CFU de *S. aureus* y/o 1.3e5 CFU de *P. aeruginosa*. En estos experimentos, los niveles de *S. aureus* fueron significativamente mayores en los ratones inoculados tanto con *P. aeruginosa* como con *S. aureus* que en los inoculados sólo con *S. aureus* 48 horas después de la inoculación (Figura 4).

Estos datos demuestran que *S. aureus* potencia el crecimiento de *P. aeruginosa*. Además, estos datos también demuestran que la combinación de *S. aureus* y *P. aeruginosa* en dosis de exposición normalmente subletales aumenta la letalidad en un modelo de infección pulmonar. A continuación se muestra un compendio de la valoración de las dosis de exposición de *P. aeruginosa* y *S. aureus* en un modelo de coinfección pulmonar en el que la exposición intranasal se realizó con la cepa *P. aeruginosa*: 6077 (exoU) : LD100 = ~1e6 y la cepa *S. aureus*: SF8300 (cMRSA) : LD100 = ~2e8.

Exposición a <i>P. aeruginosa</i> (CFU/ratón)	Exposición a <i>S. aureus</i> (CFU/ratón)	Supervivencia (7 días)
1e5	0	100 %
0	5e7	80-100 %
1e5	5e7	0-10 %
1e5	2.5e7	40 %
1e4	5e7	100 %
1e3	5e7	100 %
1e2	5e7	100 %

## Ejemplo 2: La toxina alfa de *S. aureus* potencia la infección por *P. aeruginosa*

Para determinar si la toxina alfa de *S. aureus* era necesaria para que *S. aureus* potenciara el crecimiento de *P. aeruginosa*, se realizaron experimentos con una cepa de *S. aureus* que contenía una delección en el gen que codifica la toxina alfa (también conocida como alfa-hemolisina (*hla*)). En estos experimentos, los ratones fueron inoculados con *S. aureus* de tipo salvaje (WT) o mutante ( $\Delta hla$ ) solo (infección única) o en combinación con *P. aeruginosa* (infección mixta). A continuación, se midieron los niveles de *S. aureus* y *P. aeruginosa* a las 24 y 36 horas de la inoculación. Los niveles de *S. aureus* fueron inferiores en los ratones que recibieron inoculaciones con *S. aureus* carente de toxina alfa ( $\Delta hla$ ) que con *S. aureus* de tipo salvaje. Además, los niveles de *P. aeruginosa* fueron inferiores en los ratones que recibieron inoculaciones con *S. aureus* carente de toxina alfa ( $\Delta hla$ ) que con *S. aureus* de tipo salvaje.

También se evaluó el efecto de la toxina alfa de *S. aureus* en la supervivencia de los ratones. Se inocularon ratones con 1e8 CFU de *S. aureus* de tipo salvaje, 1e8 CFU de *S. aureus* sin toxina alfa, 1e5 CFU de *P. aeruginosa* o una combinación de las mismas. Como se muestra en la Figura 5, ninguno de los ratones que recibieron tanto *S. aureus* de tipo salvaje como *P. aeruginosa* sobrevivió. Por otro lado, todos los ratones que recibieron *P. aeruginosa* o *S. aureus* sin toxina alfa sobrevivieron (Figura 5). Cabe destacar que sobrevivió un mayor número de ratones que recibieron *S. aureus* carente de toxina alfa en combinación con *P. aeruginosa* que los ratones que recibieron *S. aureus* de tipo salvaje en combinación con *P. aeruginosa* (Figura 5).

Para determinar si la toxina alfa de *S. aureus* es suficiente para potenciar el crecimiento de *P. aeruginosa*, se inocularon ratones con 1e5 CFU de *P. aeruginosa*, 0.1 µg de toxina alfa o una combinación de ambos. Los ratones inoculados sólo con *P. aeruginosa* o toxina alfa sobrevivieron, pero muchos ratones inoculados con la combinación no lo hicieron (Figura 6A). Así, la toxina alfa nativa aumenta la mortalidad cuando se combina con *P. aeruginosa*. La administración de un anticuerpo anti-alfa toxina, LC10, 24 horas antes de la inoculación fue suficiente para revertir este efecto. Los ratones que recibieron la combinación de *P. aeruginosa* y toxina alfa después de recibir LC10 sobrevivieron (Figura 6A).

Otros experimentos demostraron que los *S. aureus* muertos por calor no eran capaces de potenciar el crecimiento de *P. aeruginosa*. Los ratones inoculados con 1e5 CFU de *P. aeruginosa* en combinación con el sedimento celular o el sobrenadante obtenido de *S. aureus* muerto por calor sobrevivieron (Figura 6B).

El análisis de los niveles de *P. aeruginosa* en los ratones tratados reveló resultados similares. En particular, los ratones inoculados con 1e5 CFU de *P. aeruginosa* sola mostraron niveles bajos de crecimiento de *P. aeruginosa* (Figura 7). Sin embargo, la coinoculación con 1e8 CFU de *S. aureus*, 1e8 CFU de *S. aureus* sin toxina alfa o 0.1 mg de toxina alfa aumentó el número de *P. aeruginosa* (Figura 7). La administración de 15 mg/kg de LC10 junto con 0.1 mg de toxina alfa evitó el aumento de *P. aeruginosa* (Figura 7).

Estos datos indican que la toxina alfa de *S. aureus* es importante para la capacidad de *S. aureus* de potenciar el crecimiento de *P. aeruginosa* y es suficiente para potenciar el crecimiento de *P. aeruginosa*. Además, un anticuerpo anti-toxina alfa de *S. aureus* suprime el crecimiento de *P. aeruginosa* medicado con toxina alfa.

**Ejemplo 3: La combinación de anticuerpos anti-toxina alfa y anti-*P. aeruginosa* favorece la supervivencia en un modelo de infección polimicrobiana por *S. aureus* y *P. aeruginosa***

Para determinar si los anticuerpos podían aumentar la supervivencia de los ratones coinoculados con *P. aeruginosa* y *S. aureus*, se administró a los ratones 15 mg/kg de LC10 (un anticuerpo contra la toxina alfa de *S. aureus*) en combinación con 1 mg/kg de MEDI3902 (un anticuerpo biespecífico que se une a Psl y PcrV de *P. aeruginosa*), o 15 mg/kg de anticuerpo de control del isotipo (R347). Los anticuerpos se administraron 24 horas antes de la inoculación con 1e5 CFU de *P. aeruginosa* y/o 1e8 CFU de *S. aureus*. Los ratones inoculados únicamente con *S. aureus* o *P. aeruginosa* sobrevivieron (Figura 8). Sin embargo, los ratones inoculados tanto con *S. aureus* como con *P. aeruginosa* no sobrevivieron cuando recibieron el anticuerpo de control (Figura 8). La administración de los anticuerpos LC10 y MEDI3902 fue capaz de rescatar a los ratones que recibieron tanto *S. aureus* como *P. aeruginosa* (Figura 8).

Se realizaron experimentos similares en los que se variaron las cantidades de *S. aureus* y *P. aeruginosa* en las inoculaciones. Las inoculaciones contenían 5e7 CFU de *S. aureus* y 1.1e5 CFU de *P. aeruginosa*. La combinación de los anticuerpos LC10 y MEDI3902 aumentó drásticamente la supervivencia de los ratones durante siete días en comparación con el anticuerpo de control (R347).

Para evaluar la importancia del momento de administración de los anticuerpos protectores anti-*S. aureus* y anti-*P. aeruginosa*, se administró a los ratones 15 mg/kg de LC10 y 1 mg/kg de MEDI3902 o 15 mg/kg de R347 en tres momentos diferentes: 48 horas antes de la inoculación, 24 horas antes de la inoculación o 1 hora después de la inoculación. Todos los ratones fueron inoculados con 5e7 - 1e8 CFU de *S. aureus* y 5e4 CFU de *P. aeruginosa*. La administración en cualquiera de los tres momentos probados fue suficiente para aumentar la supervivencia de los ratones durante siete días en comparación con la administración del anticuerpo de control (Figura 9).

Estos datos demuestran que la combinación de anticuerpos anti-*S. aureus* y anti-*P. aeruginosa* previene las infecciones por colonias mixtas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

**Ejemplo 4: El anticuerpo contra la toxina alfa es suficiente para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* en un modelo de coinfección de *S. aureus* y *P. aeruginosa***

Para examinar los efectos de los anticuerpos individuales sobre el crecimiento de colonias mixtas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, se administró a los ratones (i) una combinación de 15 mg/kg de LC10 y 1 mg/kg de MEDI3902, (ii) 15 mg/kg de LC10, (iii) 1 mg/kg de MEDI3902, o (iv) 15 mg/kg de anticuerpo de control (R347). Los anticuerpos se administraron 24 horas antes de inocular a los ratones 5e7 CFU de *S. aureus* y 1e5 CFU de *P. aeruginosa*. Los pulmones se recolectaron 24 horas después de la infección y los homogeneizados se colocaron en agar selectivo para evaluar el crecimiento de *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Sorprendentemente, la administración del anticuerpo contra la toxina alfa de *S. aureus* redujo el crecimiento tanto de *S. aureus* como de *P. aeruginosa*, y la administración del anticuerpo contra *P. aeruginosa* redujo el crecimiento tanto de *S. aureus* como de *P. aeruginosa* (Figura 10).

Estos datos demuestran que los anticuerpos contra la toxina alfa de *S. aureus* pueden inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* en una colonia mixta que contiene tanto *S. aureus* como *P. aeruginosa*. Además, los anticuerpos anti-*P. aeruginosa* reducen las CFU de *S. aureus* en un modelo de coinfección *S. aureus*/*P. aeruginosa*.

**Ejemplo 5: La proliferación y diseminación sistémica de *P. aeruginosa* se correlaciona con la pérdida dependiente de la AT de la integridad de la barrera de las vías respiratorias**

La unión de AT a su receptor, ADAM10, en la superficie de la célula epitelial provoca una fuga vascular debido a la reorganización de las proteínas de unión y a la lisis celular (Bubeck Nat Med ADAM10 gp unión). Se observó necrosis epitelial en secciones pulmonares de ratones infectados con *S. aureus* o tratados con AT. Además, se observó un aumento de la hemoglobina de las vías respiratorias en los ratones infectados con *S. aureus* o AT, lo que indica la presencia de glóbulos rojos. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que la AT puede promover la diseminación de Gram-negativos mediante la perturbación de la barrera epitelial. En la infección mixta con *S. aureus* o AT purificada, el bazo contenía un número significativamente mayor de *P. aeruginosa* en comparación con los animales infectados sólo con *P. aeruginosa* (Figura 11A). No hubo diferencias en la carga bacteriana de *S. aureus* en los bazos de los ratones de los grupos mono o coinfectados (Figura 11B). La profilaxis con LC10 disminuyó significativamente el número de *P. aeruginosa* recuperados de los órganos distales a las 24 y 48 h (Figura 11C). Estos datos demuestran que la AT promueve la diseminación sistémica de *P. aeruginosa* durante una infección mixta.

**Ejemplo 6: *S. aureus* AT potencia la infección con diversas bacterias Gram negativas**

Para determinar si el efecto de la AT es específico de *P. aeruginosa* o podría observarse durante la coinfección por SA con otros organismos Gram negativos, se realizaron coinfecciones por SA con *K. pneumoniae* o *A. baumannii*. Dosis subletales de exposición IN de 5e1 CFU/ratón *K. pneumoniae* o 1e6 CFU/ratón *A. baumannii* (1/20 y 1/10 LD100 respectivamente) con 5e7 CFU/ratón *S. aureus* produjeron una letalidad del 90-100 % y un aumento de la

- 5 carga bacteriana Gram-negativa en el pulmón y los tejidos distales en comparación con las mono infecciones Gram-negativas (Figuras 12B,C,E,F). De forma similar a los resultados obtenidos con Pa, la profilaxis con LC10 y la coinfección con *Δhla* evitaron la letalidad y redujeron la carga bacteriana Gram-negativa, lo que sugiere que AT también desempeña un papel clave en la potenciación de las coinfecciones con estos patógenos. De acuerdo con esta hipótesis, la administración conjunta de una dosis subletal de AT junto con Kp o Ab fue suficiente para potenciar el crecimiento del patógeno Gram negativo e inducir una infección letal. Estos datos demuestran que la expresión de AT de *S. aureus* potencia la infección respiratoria con un intervalo de patógenos bacterianos oportunistas Gram-negativos.

# REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias VH y VL de las SEQ ID NOs: 45 y 46 para su uso en el tratamiento o prevención de una infección polibacteriana en un paciente, en el que la infección polibacteriana comprende *S. aureus* y al menos otra bacteria Gram negativa, cuyo crecimiento está potenciado por la toxina alfa de *S. aureus*.
2. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de conformidad con la reivindicación 1, en el que al menos otra bacteria es *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) o *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*).
3. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se administra durante dos o más ciclos de prevención o tratamiento.
4. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1- 3, que comprende además la administración de un segundo agente antibacteriano.
5. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de conformidad con la reivindicación 4, en el que el segundo agente antibacteriano es un antibiótico.
6. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de conformidad con la reivindicación 5, en el que el antibiótico es ciprofloxacino.
7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69.

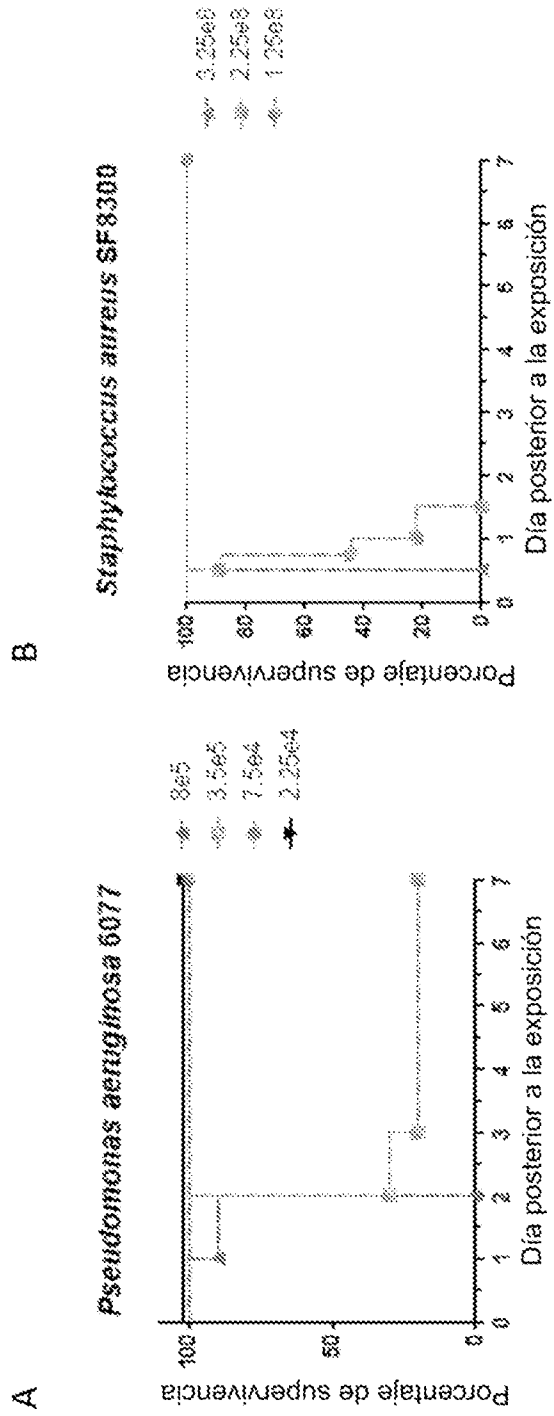
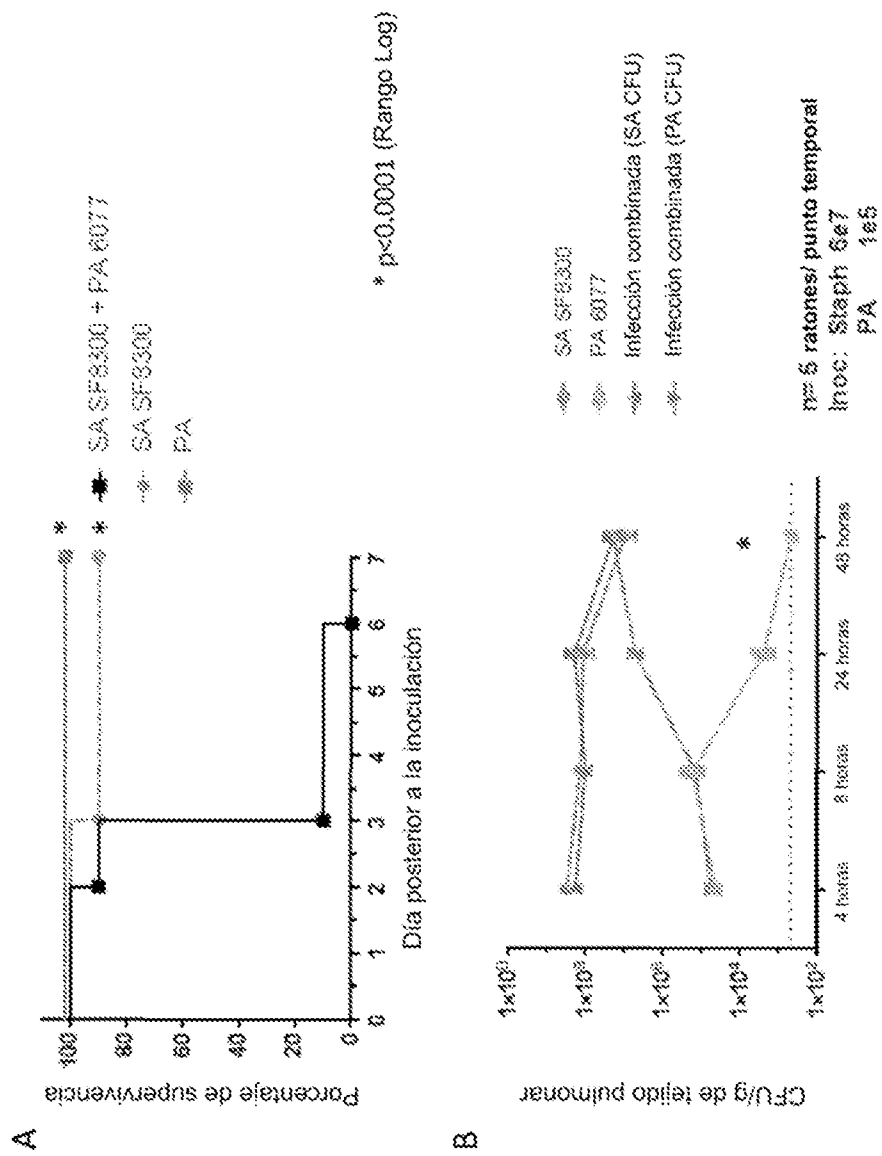


Figura 1





Tiempo posterior a la inoculación

Figura 2

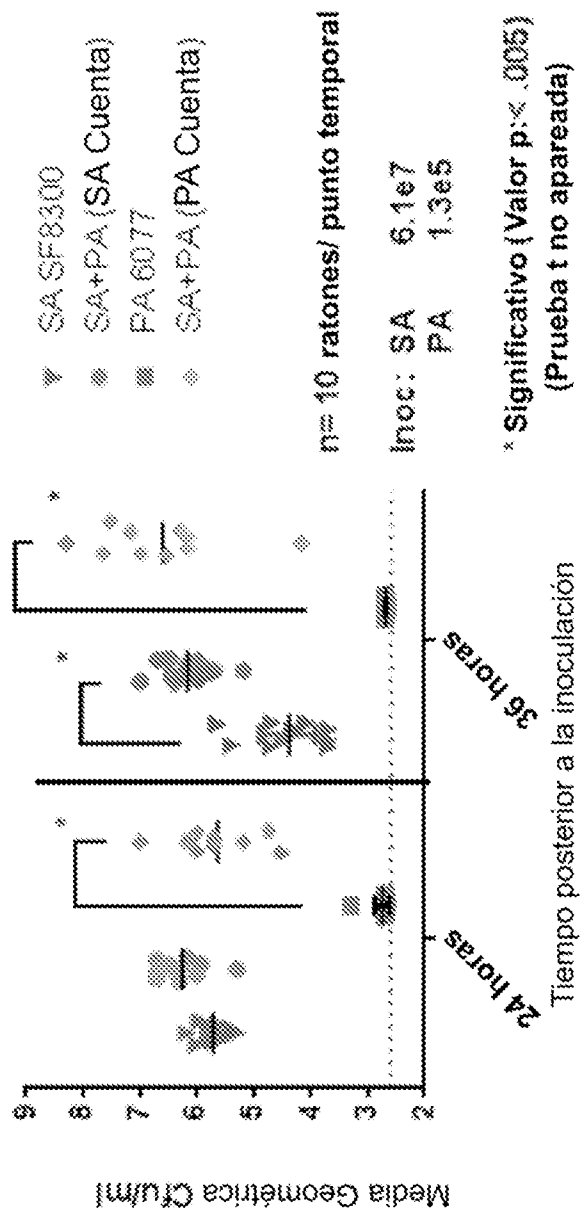


Figura 3

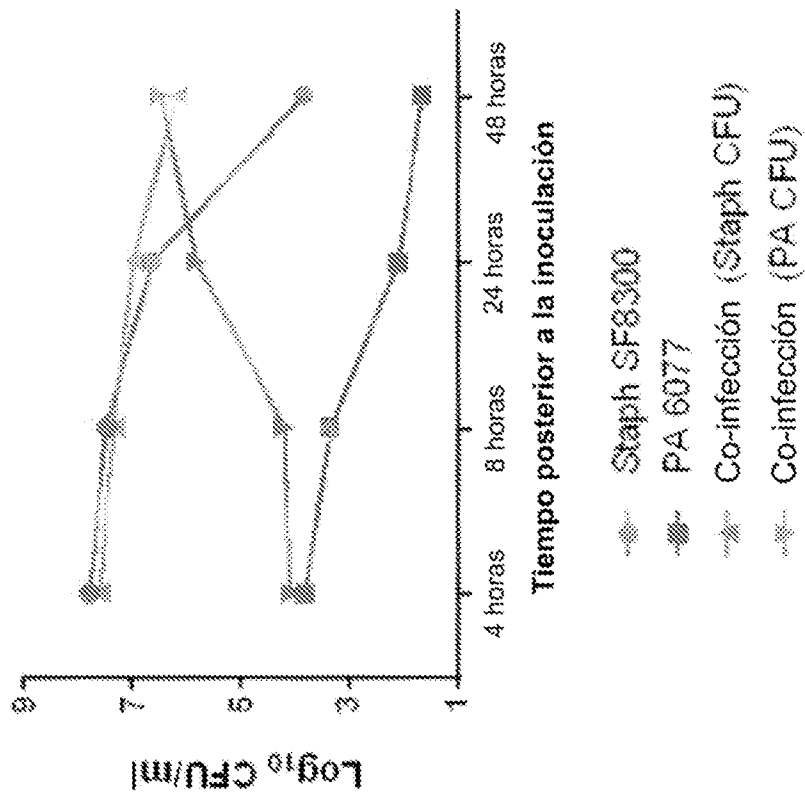


Figura 4

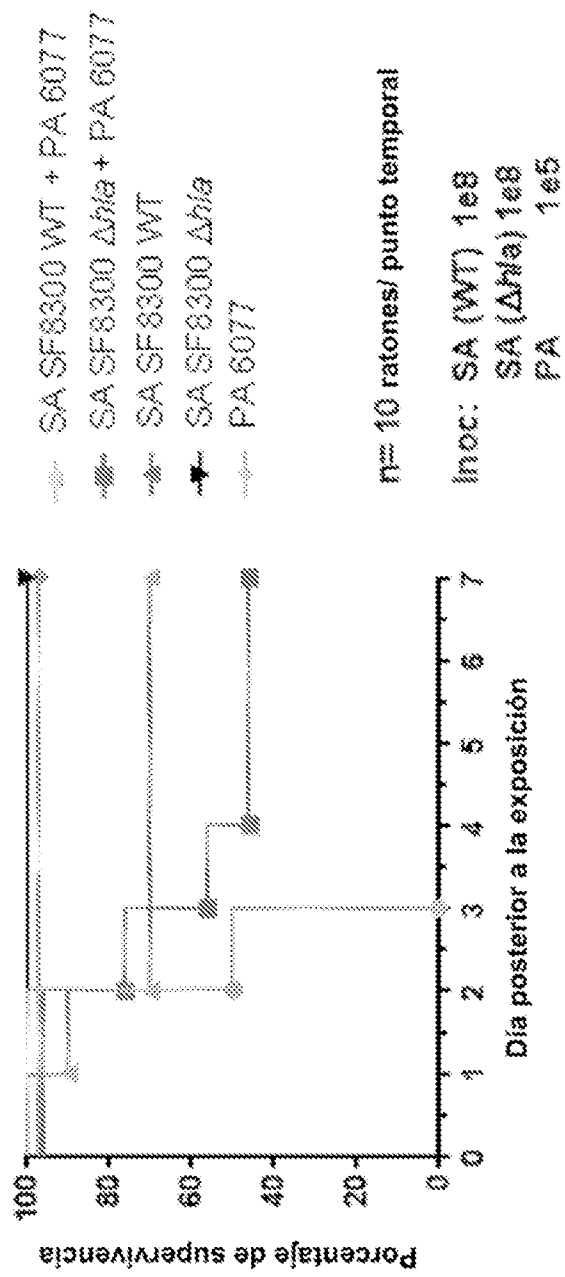


Figura 5

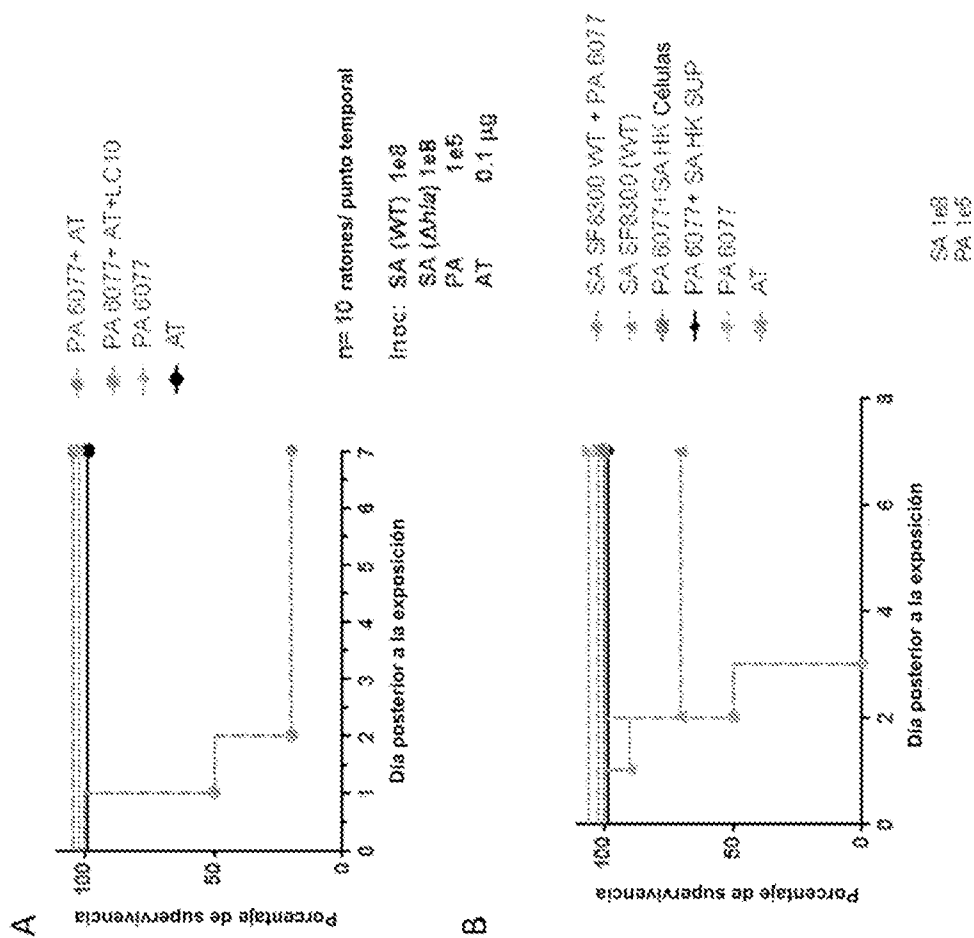


Figura 6



Figura 7

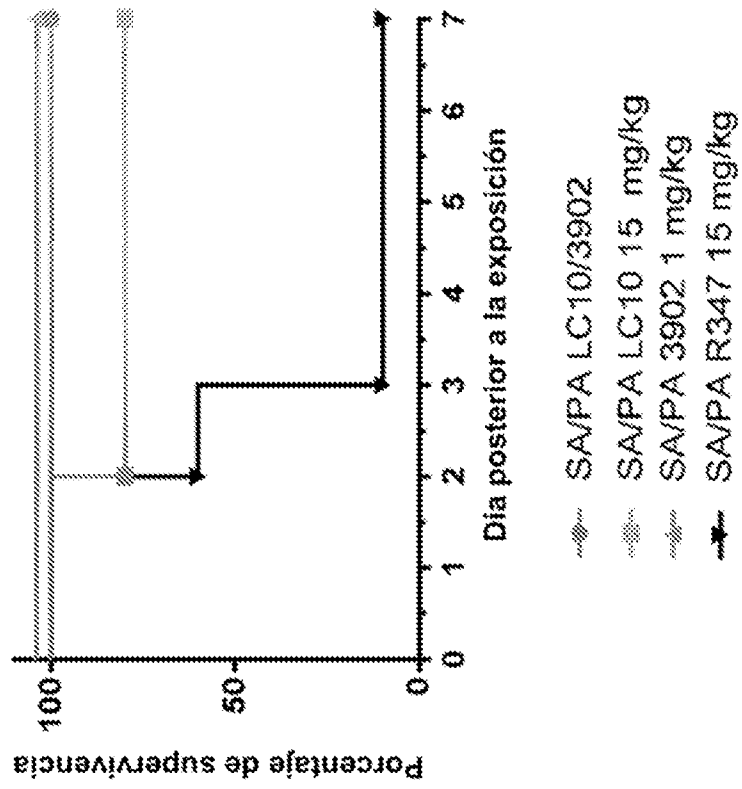


Figura 8

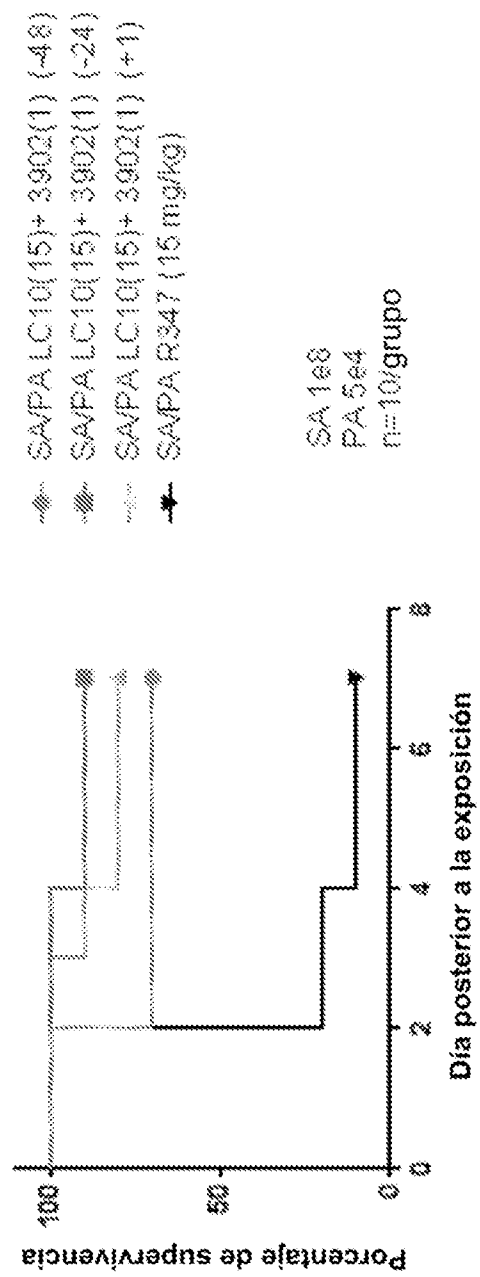


Figura 9



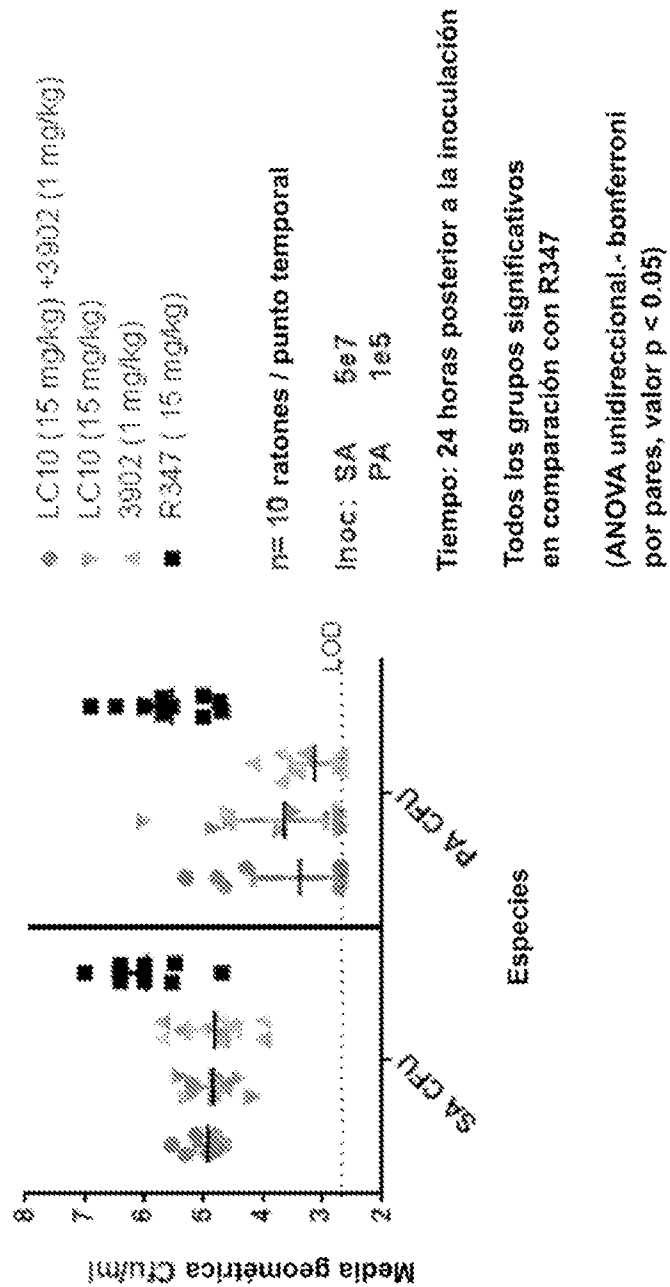


Figura 10

Figura 11A

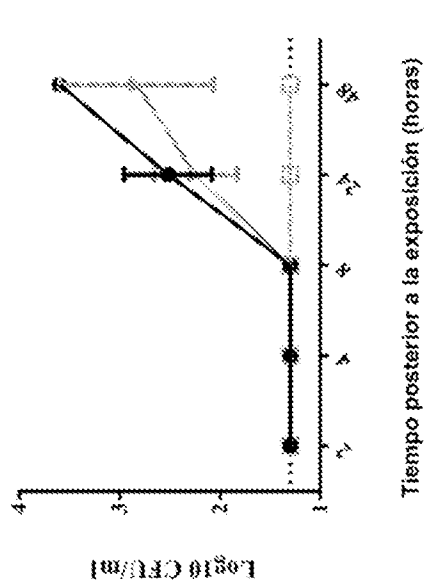


Figura 11B

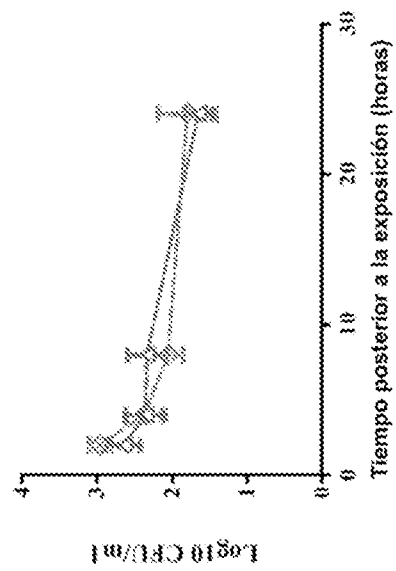
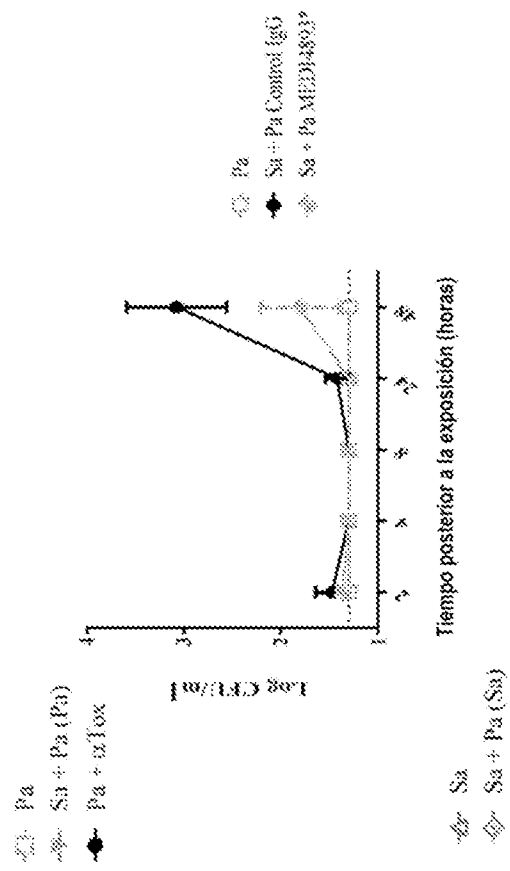
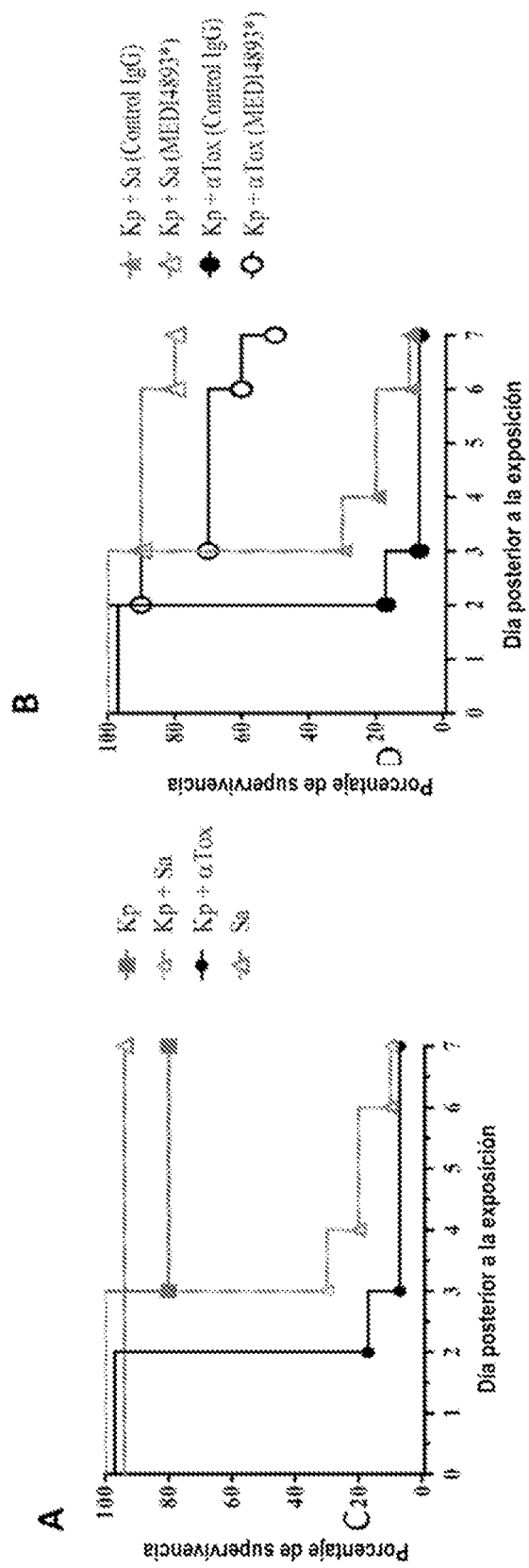


Figura 11C





5e1 CFU  
LD<sub>100</sub>=1e3

Figura 12

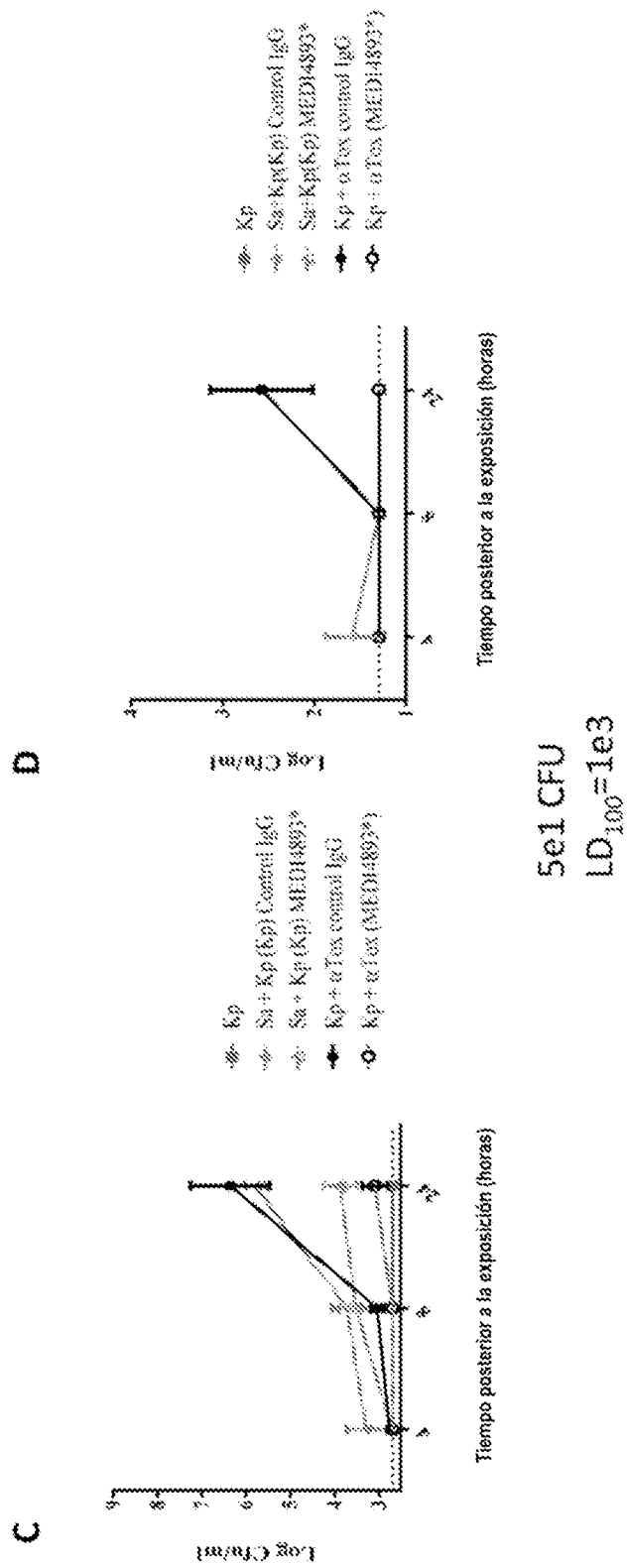


Figura 12

