

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 323**

51 Int. Cl.:

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2010 PCT/NL2010/050456**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11008092**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2010 E 10734844 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2454284**

54 Título: **Compuestos de unión específica a bacterias gram positivas**

30 Prioridad:

15.07.2009 EP 09165558
15.07.2009 US 225878 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2018

73 Titular/es:

AIMM THERAPEUTICS B.V. (50.0%)
Meibergdreef 45
1105 BA Amsterdam, NL y
GENENTECH, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

BEAUMONT, TIM;
KWAKKENBOS, MARK JEROEN;
BROWN, ERIC J.;
MORISAKI, JOHN HIROSHI;
HAZENBOS, WOUTER L.W.;
MARIATHASAN, SANJEEV;
KAJIHARA, KIMBERLY y
XIA, YI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 673 323 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

Compuestos de unión específica a bacterias gram positivas

5 La presente invención se refiere a los campos de la biología, la inmunología y la medicina.

Los microorganismos gram positivos causan la mayoría de las infecciones sistémicas. Un miembro importante de estos patógenos gram-positivos es *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Aproximadamente el 20 % de la población es un vehículo a largo plazo de *S. aureus*. *S. aureus* puede causar una gama de enfermedades desde infecciones menores de la piel, tales como granos, impétigo (también puede ser causado por *Streptococcus pyogenes*), flemones, foliculitis, celulitis, forúnculos, carbunclos, síndrome de la piel escaldada y abscesos, hasta enfermedades potencialmente mortales tales como neumonía, meningitis, osteomielitis, endocarditis, síndrome de shock tóxico (SST) y septicemia. *S. aureus* puede infectar todo tipo de órganos y tejidos. Las infecciones por *S. aureus* se producen en personas inmunocompetentes e inmune comprometidas. Aproximadamente el 50 % de las infecciones en las unidades de cuidados intensivos de EE. UU. son causadas por este patógeno. En los Estados Unidos se notifican trescientas mil infecciones por *S. aureus* por año, que dan como resultado 12.000 muertes (véase también Moran y col., NEMJ 355, 666-674 (2006)).

Un problema de gran importancia es el aumento de la resistencia a los antibióticos de *S. aureus*. *S. aureus* resistente a la metilina (SARM) apareció en la década de 1960. Inicialmente se identificó en entornos de atención sanitaria. Sin embargo, SARM parece estar presente entre personas de la comunidad que no han sido hospitalizadas. El tratamiento de SARM es difícil y costoso, debido a la sensibilidad limitada de SARM a los antibióticos. Sin embargo, hay muy pocas alternativas de antibióticos disponibles. La vancomicina se usa a menudo para tratar SARM resistente a la penicilina. La patente de los EE.UU. n.º 6.939.543 describe un anticuerpo murino contra el ácido lipoteicoico (ALT) que puede unirse a *S. aureus*. Sobre la base de este anticuerpo murino, se produjo un anticuerpo recombinante quimérico de ratón/humano que contiene dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos. Sin embargo, dicho anticuerpo quimérico de ratón/humano tiene la desventaja de que están presentes secuencias murinas, lo que implica el riesgo de efectos secundarios graves cuando se administra a seres humanos.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar medios y métodos para contrarrestar y/o evitar enfermedades relacionadas con bacterias gram-positivas. Es un objetivo adicional de la invención proporcionar compuestos de unión alternativos y/o mejorados contra diversas bacterias gram-positivas, preferentemente especies de *Staphylococcus*, más preferentemente SARM. Es un objetivo adicional de la invención proporcionar compuestos de unión humanos contra diversas bacterias gram-positivas, preferentemente especies de *Staphylococcus*, más preferentemente SARM.

La presente invención, como se define en las reivindicaciones, proporciona anticuerpos, partes funcionales de los mismos que pueden unirse a especies de *Staphylococcus* en su contexto natural. Por lo tanto, son útiles para contrarrestar y/o evitar y/o diagnosticar trastornos relacionados con la presencia de especies de *Staphylococcus*. Preferentemente, *S. aureus* es contrarrestado. En una realización particularmente preferente, SARM es contrarrestado. Otra especie de *Staphylococcus* preferente que se contrarresta es *Staphylococcus epidermidis*.

Staphylococcus epidermidis generalmente no es patógeno, pero los pacientes con un sistema inmune comprometido a menudo están en riesgo de desarrollar una infección. Las infecciones pueden ser adquiridas tanto en el hospital como en la comunidad, pero representan una mayor amenaza para los pacientes del hospital. Los más susceptibles a la infección por *S. epidermidis* son los usuarios de fármacos intravenosos, recién nacidos, ancianos y aquellos que usan catéteres u otros aparatos artificiales. Las infecciones se asocian con dispositivos intravasculares (válvulas cardíacas protésicas, derivaciones, etc.) pero también se producen comúnmente en articulaciones protésicas, catéteres y grandes heridas. Los síntomas incluyen fiebre, dolor de cabeza, cansancio, anorexia y disnea.

En una realización preferente, la presente invención proporciona anticuerpos humanos aislados o recombinantes o partes funcionales de los mismos que pueden unirse específicamente a especies de *Staphylococcus*. Los anticuerpos humanos y las partes funcionales de acuerdo con la invención pueden unirse a especies de *Staphylococcus* en su contexto natural, de modo que se contrarrestan diversas especies de *Staphylococcus* tras la administración de dichos anticuerpos o partes funcionales de los mismos. Dichos anticuerpos humanos o partes funcionales de los mismos son por lo tanto particularmente adecuados para el tratamiento o la prevención de la infección por dichas especies de *Staphylococcus*. Dichos anticuerpos humanos o partes funcionales de los mismos de acuerdo con la invención son más adecuados para uso terapéutico y/o profiláctico para individuos humanos, en comparación con anticuerpos quiméricos, debido a la ausencia de secuencias no humanas. Esto reduce significativamente el riesgo de efectos secundarios adversos.

Un anticuerpo particularmente preferente de acuerdo con la presente invención es el anticuerpo designado "F1", que tiene secuencias de dominio variable de cadena pesada y cadena ligera como se representa en la Figura 1. El término "F1", tal como se usa en el presente documento, abarca todos los anticuerpos F1, por ejemplo F1 aislado o producido de manera recombinante. F1 producido de manera recombinante también se denomina en el presente

documento "rF1". Las secuencias de CDR de F1, que en particular contribuyen a las propiedades de unión al antígeno de F1, también se representan en la Figura 1. El anticuerpo F1 es completamente humano, puede unirse específicamente a especies de *Staphylococcus* tales como *S. aureus* y *S. epidermidis* y, por lo tanto, se prefiere para uso terapéutico para individuos humanos.

5 Es importante destacar que, el anticuerpo F1 puede unirse a bacterias completas tanto *in vivo* como *in vitro*. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo humano aislado o recombinante o una parte funcional del mismo, que puede unirse específicamente a *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. Además, el anticuerpo F1 puede unirse a bacterias que se han cultivado en tejido infectado de, por ejemplo, un animal. Por lo tanto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une a *S. aureus* cultivada *in vivo*, en el que "cultivado *in vivo*" se define como cultivado en el tejido infectado de un animal durante la infección con *S. aureus*. También se proporciona una cadena de inmunoglobulina aislada, recombinante o sintética o un equivalente funcional de la misma que comprende al menos una secuencia de CDR de una región variable de inmunoglobulina humana que es específica para *S. aureus* y/o *S. epidermidis*.

15 Una parte funcional de un anticuerpo se define como una parte que tiene al menos una propiedad compartida como dicho anticuerpo en tipo, no necesariamente en cantidad. Dicha parte funcional puede unirse al mismo antígeno como dicho anticuerpo, aunque no necesariamente en la misma medida. Una parte funcional de un anticuerpo comprende preferentemente un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo monocatenario, un nanocuerpo, un unicuerpo, un fragmento variable monocatenario (scFv), un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂.

20 También se produce una parte funcional de un anticuerpo modificando un anticuerpo de manera que al menos una propiedad -preferentemente una propiedad de unión a antígeno- del compuesto resultante sea esencialmente del mismo tipo, no necesariamente en cantidad. Esto se realiza de muchas maneras, por ejemplo mediante sustitución conservativa de aminoácidos, en la que un resto de aminoácido se sustituye por otro resto con propiedades generalmente similares (tamaño, hidrofobicidad, etc.), de manera que es probable que el funcionamiento global no se vea gravemente afectado.

25 Como es bien sabido por la persona experta, una cadena pesada de un anticuerpo es la más grande de los dos tipos de cadenas que constituyen una molécula de inmunoglobulina. Una cadena pesada comprende dominios constantes y un dominio variable, cuyo dominio variable está implicado en la unión al antígeno. Una cadena ligera de un anticuerpo es la más pequeña de los dos tipos de cadenas que constituyen una molécula de inmunoglobulina. Una cadena ligera comprende un dominio constante y un dominio variable. El dominio variable está implicado en la unión al antígeno junto con el dominio variable de la cadena pesada.

35 Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son las regiones hipervariables presentes en los dominios variables de cadena pesada y los dominios variables de cadena ligera. Las CDR de una cadena pesada y la cadena ligera conectada de un anticuerpo juntas forman el sitio de unión al antígeno.

40 Las secuencias de CDR mencionadas anteriormente son las secuencias de CDR del anticuerpo F1; VH IgHV3-23 y VL IgKV1-5, y variantes de las mismas. Los compuestos de unión que comprenden CDR de F1 son particularmente adecuados para contrarrestar y/o evitar (los efectos de) infecciones por *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. Se descubrió que una variante de F1, que comprende VH IgHV3-23 y VL IgKV1-5, en la que la isoleucina en la CDR3 de cadena ligera de la cadena ligera se modificó a una metionina, aún no podía unirse específicamente a especies de *Staphylococcus* tales como *S. aureus* y *S. epidermidis*.

45 El anticuerpo F1 particularmente preferente, descrito anteriormente, comprende secuencias de CDR que consisten en las secuencias de CDR representadas en la Figura 1. Una realización particularmente preferente de acuerdo con la invención proporciona así un anticuerpo aislado, sintético o recombinante que puede unirse específicamente a *S. aureus* y/o *S. epidermidis* y que comprende:

- 50
- una secuencia de CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia RFAMS (SEQ ID NO:1), y
 - una secuencia de CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia SINNGNNPYARSVQY (SEQ ID NO:2),
 - y
 - una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO:3), y
 - 55 - una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia RASENVGDWLA (SEQ ID NO:4), y
 - una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia KTSILES (SEQ ID NO:5), y
 - una secuencia de CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia QHYXRFPTYT, en la que X es I o M (SEQ ID NO:6).

60 Además de optimizar las secuencias de CDR con el fin de mejorar la eficacia o estabilidad de unión, a menudo es ventajoso optimizar al menos una secuencia en al menos una de las regiones marco. Esto se realiza preferentemente con el fin de mejorar la eficacia o estabilidad de unión. Las secuencias marco se optimizan, por ejemplo, mediante la mutación de una molécula de ácido nucleico que codifica dicha secuencia marco en las que después se prueban preferentemente las características del anticuerpo resultante o la parte funcional. De esta forma, es posible obtener anticuerpos o partes funcionales mejoradas. En una realización preferente, las secuencias de la línea germinal humana se usan para regiones marco en anticuerpos o partes funcionales de los mismos de

acuerdo con la invención. El uso de secuencias de línea germinal preferentemente minimiza el riesgo de inmunogenicidad de dichos anticuerpos o partes funcionales, ya que es menos probable que estas secuencias contengan modificaciones somáticas que son particulares para los individuos de los que proceden las regiones marco, y pueden causar una respuesta inmunogénica cuando se aplican a otro individuo humano.

5 Los anticuerpos o las partes funcionales de los mismos que comprenden una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de cadena pesada como se representa en la Figura 1 también se proporcionan. Dicha secuencia de cadena pesada proporciona propiedades de unión deseadas, como se prueba por el anticuerpo F1. Además, las secuencias de aminoácidos de cadena ligera que tienen al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la cadena ligera como se representa en la Figura 1, y una secuencia de cadena ligera en la que una isoleucina en CDR3 se modifica a metionina, también proporciona propiedades de unión deseadas, como se prueba por el anticuerpo F1, y una variante del anticuerpo F1 que comprende dicha modificación. Por tanto, se proporciona además un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención, que tiene una secuencia de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNPPYYARSVQYRFTVSRDVSQ
NTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFDS WGPGLTLTVSS (SEQ ID NO:7) y/o que tiene una secuencia de cadena ligera que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG

20 VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKLEIKRTV,

en la que X es I o M (SEQ ID NO:8).

25 Se han desarrollado varias variantes del anticuerpo F1, además de la variante indicada anteriormente en el presente documento, en la que una isoleucina en la CDR3 de cadena ligera se modifica a metionina. Estas variantes pueden unirse a especies de *Staphylococcus*. Ejemplos de dichas variantes de anticuerpos incluyen anticuerpos o partes funcionales de acuerdo con la invención, que tienen una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNPPYYARSVQYRFTVSRDVSQ NTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFDS WGPGLTLTVSS (SEQ ID NO:9), y/o la secuencia

30 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNPPYYARSVQYRFTVSRDVSQ NTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPTFDS WGPGLTLTVSS (SEQ ID NO:7), y una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG

35 VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKLEIKRA,

en la que X es I o M (SEQ ID NO:10), y/o la secuencia

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG

VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKVEIKRTV,

40 en la que X es I o M (SEQ ID NO:11), y/o la secuencia

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG

VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKLEIKRTV,

45 en la que X es I o M (SEQ ID NO:8).

50 Un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención se une específicamente a proteínas que comprenden una repetición de serina-aspartato (SD). Las proteínas con repeticiones SD (Sdr) son proteínas asociadas a la superficie celular que están presentes en varias bacterias, tales como especies de *Staphylococcus*. Las proteínas Sdr en general comprenden una secuencia señal amino terminal, un dominio funcional denominado región A, una región de repetición SD, una región que abarca la pared celular, un motivo LPXTG, un dominio hidrófobo que abarca la membrana, y una serie de restos cargados positivamente. El motivo LPXTG es el objetivo de una transpeptidasa que escinde el motivo entre restos de treonina y glicina y ancla la proteína al peptidoglicano de la pared celular de bacterias gram-positivas. Se cree que las proteínas Sdr interactúan con las moléculas del huésped. Las proteínas Sdr conocidas incluyen ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD y SdrE de *S. aureus*, SdrF, SdrG y SdrH de *S. epidermidis*, SdrI de *S. saprophyticus*, SdrX de *S. capitis*, y SdrY y SdrZ de *S. caprae*.

Por lo tanto, un anticuerpo preferente o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención se une

específicamente a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. capitis* y *S. caprae*. Se prefiere que dicho anticuerpo o parte funcional del mismo se una a ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD y SdrE de *S. aureus*, SdrF, SdrG y SdrH de *S. epidermidis*, SdrI de *S. saprophyticus*, SdrX de *S. capitis*, y SdrY y SdrZ de *S. caprae*. El epítipo del anticuerpo o la parte funcional del mismo de acuerdo con la invención comprende un epítipo dependiente de la repetición SD en proteínas Sdr, por ejemplo epítipos dependientes de la repetición SD como los presentes en ClfA, ClfB, SdrC, SdrD y SdrE de *S. aureus*. Un epítipo dependiente de la repetición SD se define en el presente documento como un epítipo reconocido por el anticuerpo F1, cuyo epítipo requiere la presencia de al menos parte de una región de repetición SD como las presentes en, pero sin limitación, ClfA, ClfB, SdrC, SdrD y SdrE de *S. aureus* y SdrF, SdrG y SdrH de *S. epidermidis*. En una realización, dicho epítipo puede comprender al menos parte de una molécula que se une a, o está asociada con, una proteína Sdr. Ejemplos de dichas moléculas incluyen, pero sin limitación, aminoácidos, péptidos, proteínas, azúcares y restos de azúcar. En otra realización, dicho epítipo comprende modificaciones de la región de repetición SD. Dichas modificaciones comprenden, por ejemplo, pero sin limitación, glucosilación, amidación y/o fosforilación. Será evidente para una persona experta que la combinación de estas dos realizaciones también es posible.

Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención que puede unirse a un epítipo dependiente de la repetición SD. También se proporciona un anticuerpo o una parte funcional que puede unirse a ClfA, ClfB, SdrC, SdrD y SdrE de *S. aureus*. Se divulga además un anticuerpo o una parte funcional o una cadena de inmunoglobulina o un equivalente funcional que puede competir con un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la presente invención para unirse a una especie de *Staphylococcus*, preferentemente *S. aureus* y/o *S. epidermidis* y/o *S. saprophyticus* y/o *S. capitis* y/o *S. caprae*, más preferentemente SARM.

Una desventaja de los anticuerpos es que su estabilidad puede reducirse, por ejemplo, en condiciones severas. Por ejemplo, se puede producir la desamidación, la eliminación de un grupo amida funcional. La desamidación es una vía de degradación de proteínas que puede afectar las funciones biológicas de las proteínas, y que se produce principalmente en los restos de asparagina, y en menor grado en los restos de glutamina. Por lo tanto, en una realización, la desamidación de un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención se evita reemplazando una asparagina o una glutamina por otro aminoácido. Una asparagina se reemplaza preferentemente por un aminoácido distinto de la glutamina, porque la desamidación también se puede producir en un resto de glutamina. La sustitución de una asparagina preferentemente no afecta sustancialmente a la afinidad de unión de un anticuerpo de acuerdo con la invención a un antígeno. En una realización, la desamidación de una asparagina en la posición 53 de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat, 1991) se evita reemplazando dicha asparagina por serina. Al evitar la desamidación de una asparagina en la posición 53, la estabilidad de un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención aumenta preferentemente. Como se muestra en los ejemplos, a pesar de que dicha asparagina se encuentra en una CDR, la sustitución de una asparagina en dicha posición no afecta sustancialmente a la afinidad de unión por un antígeno de un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención. Por lo tanto, también se proporciona por la invención por lo tanto un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención, en la que una asparagina, preferentemente una asparagina en la posición 53 de la cadena pesada, se reemplaza por otro aminoácido, preferentemente serina.

En una realización, un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención se acopla a otro resto para formar conjugados de anticuerpo-fármaco. Un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención está acoplado, por ejemplo, a un agente citotóxico, tal como un antibiótico. La expresión "agente citotóxico" tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que reduce o bloquea la función, o el crecimiento de bacterias y/o provoca la destrucción de bacterias. Dicho otro resto, por ejemplo un agente citotóxico, está preferentemente acoplado a dicho anticuerpo o parte funcional del mismo a través de un grupo tiol. Por lo tanto, preferentemente, se incorporan una o más cisteínas en dicho anticuerpo o parte funcional del mismo. Las cisteínas contienen un grupo tiol y, por lo tanto, la incorporación de una o más cisteínas, o la sustitución de uno o más aminoácidos por una o más cisteínas de un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención permiten el acoplamiento del mismo a otro resto. Dichas una o más cisteínas se introducen preferentemente en un anticuerpo de parte funcional del mismo de acuerdo con la invención en una posición en la que no influye en el plegamiento de dicho anticuerpo o parte funcional, y no modifica la unión al antígeno o la función efectora. Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención en la que al menos un aminoácido distinto de cisteína ha sido reemplazado por una cisteína. Preferentemente, al menos dos aminoácidos distintos de cisteína han sido reemplazados por cisteína. En una realización preferente, dicho al menos un aminoácido distinto de cisteína es valina en la posición 15 de la cadena ligera, y/o alanina en la posición 144 de la cadena ligera, y/o serina en la posición 168 de la cadena ligera, y/o valina en la posición 205 de la cadena ligera y/o valina en la posición 110 de la cadena ligera, y/o alanina en la posición 84 de la cadena pesada, y/o alanina en la posición 114 de la cadena pesada, y/o alanina en la posición 168 de la cadena pesada, y/o serina en la posición 172 de la cadena pesada, más preferentemente valina en la posición 205 de la cadena ligera y/o valina en la posición 110 de la cadena ligera, y/o alanina en la posición 114 de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat, 1991). Una persona experta entenderá que, como alternativa o además, uno o más de otros aminoácidos de la cadena pesada y/o ligera pueden reemplazarse por cisteína si la sustitución no influye en el plegamiento de dicho anticuerpo, y no modifica la unión al antígeno o la función efectora.

En las solicitudes de patente internacional WO2006/034488, WO2008/141044, WO2009/052249, WO2009/012256,

WO2009/012268 y WO2009/099728 se describen los métodos para modificar anticuerpos por ingeniería genética con restos de cisteína reactivos, así como las posiciones de aminoácidos adecuadas para modificar genéticamente la cisteína.

5 Un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención comprende preferentemente una secuencia variable de cadena pesada y/o una secuencia variable de cadena ligera que es al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, lo más preferentemente al menos 95 % idéntica a una secuencia de cadena pesada y/o la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 1 o una secuencia de cadena pesada y/o la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 1,
10 en la que la isoleucina en CDR3 se modifica a una metionina. Cuanto mayor es la identidad, más se parece el compuesto de unión al anticuerpo F1. Un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención comprende preferentemente una cadena pesada así como una cadena ligera que se parece a la cadena pesada y ligera de F1. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo o una parte funcional del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada y una secuencia de cadena ligera que son al menos 70 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, lo más preferentemente al menos 95 % idénticas a la secuencia de cadena pesada y/o la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 1 o una secuencia de cadena pesada y/o la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 1, en la que la isoleucina en CDR3 se modifica a una metionina. En una realización, se proporciona un anticuerpo o una parte funcional que tiene una secuencia de cadena pesada como se representa en la Figura 1 y una secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 1 o una secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 1 en la que la isoleucina en CDR3 se modifica a una metionina.

Una realización proporciona un anticuerpo o una parte funcional del mismo que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en la secuencia de cadena pesada como se representa en la Figura 1, y/o que
25 comprende una secuencia de cadena ligera que consiste en la secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 1 o una secuencia de cadena ligera como se muestra en la Figura 1 en la que la isoleucina en CDR3 se modifica a una metionina. Como alternativa, como es bien sabido por la persona experta, es posible generar una secuencia de cadena pesada o cadena ligera acortada mientras se mantiene una propiedad de unión de interés. Preferentemente, se genera dicha cadena ligera o cadena pesada acortada que tiene una región constante más corta, en comparación con la cadena pesada o ligera original. Preferentemente, el dominio variable se mantiene. Por ejemplo, se produce un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂ o un anticuerpo de dominio único o un anticuerpo monocatenario o un nanocuerpo o un unicuerpo o un fragmento scFv basado en una secuencia de cadena pesada o una secuencia de cadena ligera representada en la Figura 1. Por lo tanto, también se proporciona una parte funcional de un anticuerpo que comprende al menos una parte funcional de una secuencia como se representa en la
30 Figura 1, o una secuencia de cadena ligera como se representa en la Figura 1 en las que la isoleucina en CDR3 se modifica a una metionina.

La invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico aislada sintética o recombinante como se define en las reivindicaciones con una longitud de al menos 15 nucleótidos, preferentemente al menos 30 nucleótidos, más preferentemente al menos 50 nucleótidos, más preferentemente al menos 75 nucleótidos, que codifica un compuesto de unión de acuerdo con la invención. Dicho ácido nucleico se aísla, por ejemplo, de una célula B que puede producir un anticuerpo de acuerdo con la invención. Una realización preferente proporciona una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con al menos 15 nucleótidos de una secuencia de ácido nucleico como se representa en la Figura 1. Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención comprende preferentemente una secuencia que tiene al menos 75 %, más preferentemente al menos 80 %, más preferentemente al menos 85 %, más preferentemente al menos 90 %, lo más preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con al menos 15 nucleótidos de una secuencia de ácido nucleico como se representa en la Figura 1. Dicha secuencia de ácido nucleico como se representa en la Figura 1 comprende al menos una secuencia codificante de CDR.

Una realización preferente proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante con una longitud de al menos 15 nucleótidos, que codifica al menos una secuencia de CDR de un anticuerpo o una cadena de inmunoglobulina de acuerdo con la invención. Las secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones CDR de F1 se representan en la Figura 1. Por lo tanto, se proporciona además una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en
55 cgctttgccatgagc (SEQ ID NO: 12), tcgatcaataatgggaataaccatactacgcacggtcggtacaatac (SEQ ID NO: 13), gatcaccctagtagtggtggccacctttgactcc (SEQ ID NO:14), cgggccagtgaaaacgttggtgactggtggcc (SEQ ID NO:15), aagacatctattctagaagaagt (SEQ ID NO:16) y caacactatatacgtttcccgtagact (SEQ ID NO:17).

60 Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención preferentemente codifica una región que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con una cadena pesada de F1 y/o una cadena ligera de F1. Una realización proporciona así una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante, que comprende una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad de secuencia con la secuencia

65 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNPPYYARSVQYRFTVSRDVSQ NTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPFTFDS WPGPTLTVVSS (SEQ ID NO:7), y/o al menos 70 % de

identidad de secuencia con la secuencia

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG
VPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGQG'TKLEIKR'V,

- 5 en la que X es I o M (SEQ ID NO:8). También se proporcionan secuencias de ácido nucleico que codifican variantes del anticuerpo F1 de acuerdo con la invención. La invención proporciona, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos que codifican una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNPPYYARSVQYRFTVSRDVSQ
10 NTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPFTDS WPGTLVTVSS (SEQ ID NO:9), y/o la secuencia EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNPPYYARSVQYRFTVSRDVSQ NTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSGWPFTDS WPGTLVTVSS (SEQ ID NO:7), y que codifica una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG
VPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGQG'TKLEIKRA,

- 15 en la que X es I o M (SEQ ID NO:10), y/o la secuencia

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG
VPSRFGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGQG'TKVEIKR'V,

- 20 en la que X es I o M (SEQ ID NO:11), y/o la secuencia

DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESG
VPSRFGSGSCGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPYTFGQG'CKLEIKR'V,

en la que X es I o M (SEQ ID NO:8).

- 25 En una realización, una asparagina en la posición 53 de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat, 1991) se reemplaza por otro aminoácido distinto de la glutamina, con el fin de evitar la desamidación de la asparagina en dicha posición. Preferentemente, dicha asparagina se reemplaza por una serina.
- 30 La expresión "% de identidad de secuencia" se define en el presente documento como el porcentaje de restos en un aminoácido candidato de secuencia de ácido nucleico que es idéntico a los restos en una secuencia de referencia después de alinear las dos secuencias e introducir espacios, si es necesario, para conseguir el máximo por ciento de identidad. Los métodos y los programas de ordenador para la alineación son bien conocidos en la técnica.
- 35 Tal como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico de la invención comprende preferentemente una cadena de nucleótidos, más preferentemente ADN y/o ARN. En otras realizaciones, una molécula de ácido nucleico o una secuencia de ácido nucleico de la invención comprende otros tipos de estructuras de ácido nucleico tales como, por ejemplo, una hélice de ADN/ARN, ácido peptidonucleico (APN), ácido nucleico bloqueado (ANB) y/o una ribozima. Dichas otras estructuras de ácido nucleico se denominan equivalentes funcionales de una secuencia de ácido nucleico. La expresión "equivalente funcional de una secuencia de ácido nucleico" también abarca una cadena que comprende nucleótidos no naturales, nucleótidos modificados y/o bloques de construcción no nucleotídicos que muestran la misma función que los nucleótidos naturales.
- 40 Una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención es particularmente útil para generar compuestos de unión que son específicos para *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. Esto se realiza, por ejemplo, introduciendo dicha secuencia de ácido nucleico en una célula de modo que la maquinaria de traducción de ácido nucleico de la célula produzca el compuesto de unión codificado. En una realización, los genes que codifican una cadena pesada y/o ligera de acuerdo con la invención se expresan en las denominadas células productoras, tales como, por ejemplo, células de un ovario de hámster chino (CHO), NSO (un mieloma de ratón) o una línea celular 293(T), algunas de las cuales están adaptadas a la producción comercial de anticuerpos. La proliferación de dichas células productoras da como resultado una línea celular productora que puede producir anticuerpos o partes funcionales de los mismos de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, dicha línea celular productora es adecuada para producir compuestos para uso en seres humanos. Por lo tanto, dicha línea celular productora está preferentemente libre de agentes patógenos tales como microorganismos patógenos. Lo más preferentemente, los

compuestos de unión que consisten en secuencias humanas se generan usando una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, también se proporciona una célula productora de anticuerpos aislados o recombinantes que puede producir un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención, así como un método para producir un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención, que comprende proporcionar una célula con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención, y que permite que dicha célula traduzca dicha secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención, produciendo de ese modo dicho anticuerpo o parte funcional de acuerdo con la invención.

Una célula productora de anticuerpos se define en el presente documento como una célula que puede producir y/o secretar un anticuerpo o una parte funcional del mismo, y/o que puede desarrollarse en una célula que puede producir y/o secretar un anticuerpo o una parte funcional del mismo. Una célula productora de anticuerpos de acuerdo con la invención es preferentemente una célula productora que está adaptada a la producción comercial de anticuerpos. Preferentemente, dicha célula productora es adecuada para producir compuestos para uso en seres humanos.

Un método de acuerdo con la invención preferentemente comprende además una etapa de recogida, purificación y/o aislamiento de dicho anticuerpo o parte funcional de acuerdo con la invención. Los compuestos de unión así obtenidos de acuerdo con la invención se usan preferentemente en el diagnóstico de infección por *Staphylococcus*, aislamiento o detección de bacterias *Staphylococcus*, distinguiendo entre especies de *Staphylococcus* y otras bacterias gram positivas y terapia humana, opcionalmente después de la purificación adicional, el aislamiento y/u otras etapas de procesamiento.

Un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la presente invención es particularmente adecuado para usos de diagnóstico. Por ejemplo, una muestra, tal como un tejido o una muestra de sangre, se puede obtener de un individuo o de cualquier otra fuente que se sospeche que está infectada con una bacteria *Staphylococcus*, preferentemente *S. aureus* y/o *S. epidermidis*, más preferentemente SARM. Posteriormente, dicha muestra puede mezclarse con un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención. Dicho anticuerpo o parte funcional se unirá específicamente a la bacteria *Staphylococcus*, preferentemente *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. Las bacterias unidas a un anticuerpo o a una parte funcional se pueden aislar de la muestra usando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, pero sin limitación, aislamiento usando perlas magnéticas, perlas recubiertas con estreptavidina o aislamiento mediante el uso de anticuerpos secundarios inmovilizados en una columna. Después del lavado de la bacteria unida y el anticuerpo o la parte funcional del mismo, las bacterias pueden eluirse de dicho anticuerpo o parte funcional por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la unión entre las bacterias y el anticuerpo o una parte funcional puede interrumpirse aumentando la concentración de sales y/o reduciendo o aumentando el pH, y/o mediante la adición de un exceso de epítipo.

El aislamiento de bacterias *Staphylococcus*, preferentemente *S. aureus* y/o *S. epidermidis*, se puede usar para diversas aplicaciones. Por ejemplo, la infección con varias bacterias grampositivas diferentes puede dar como resultado el solapamiento de síntomas en un individuo. En dichos casos, puede ser difícil discriminar entre *S. aureus* y/o *S. epidermidis*, y otras bacterias grampositivas. Un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la presente invención se puede usar luego para detectar la presencia de *S. aureus* y/o *S. epidermidis*, o para distinguir entre *S. aureus* y/o *S. epidermidis* y otras bacterias. El aislamiento de bacterias de una muestra de un individuo del que se sospecha que padece una infección con *S. aureus* y/o *S. epidermidis* o de cualquier otra fuente, tal como un cultivo bacteriano, puede facilitar la detección de dichas bacterias *Staphylococcus*, porque el aislamiento da como resultado un aumento de la concentración y/o una mayor pureza de dichas bacterias *Staphylococcus*.

El aislamiento de especies *Staphylococcus*, preferentemente *S. aureus* y/o *S. epidermidis*, más preferentemente SARM, puede usarse adicionalmente, por ejemplo, para identificar la cepa de *S. aureus* y/o *S. epidermidis* específica, preferentemente la cepa SARM en una muestra. La identificación de dicha cepa se puede realizar, por ejemplo, determinando la secuencia del ADN bacteriano. En dicho caso, se prefiere obtener primero *S. aureus* y/o *S. epidermidis* aislados.

En una realización de la invención, un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la presente invención se marca con el fin de poder detectar dicho anticuerpo o parte funcional, por ejemplo, pero sin limitación, marcado fluorescentemente o marcado radiactivamente. Como alternativa, un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención se detecta usando un anticuerpo secundario marcado que se dirige contra dicho anticuerpo o parte funcional del mismo de acuerdo con la invención. Si se detecta la unión de dicho anticuerpo o parte funcional del mismo, *S. aureus* y/o *S. epidermidis* está presente.

Por lo tanto, la invención proporciona un uso de un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención para el diagnóstico de una infección por *Staphylococcus*, preferentemente infección por *S. aureus*, más preferentemente infección por SARM, para detectar *S. aureus* y/o *S. epidermidis*, preferentemente SARM, y para distinguir entre *S. aureus* y/o *S. epidermidis*, preferentemente SARM y otras bacterias gram-positivas. También se proporciona un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención para su uso en el

diagnóstico de una infección, por *Staphylococcus*, preferentemente infección por *S. aureus*, más preferentemente infección por SARM.

5 Se proporciona además un método para aislar bacterias de *S. aureus* y/o *S. epidermidis* a partir de una solución que usa un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención. Dicho método preferentemente comprende proporcionar una muestra de un individuo sospechoso de padecer una infección con *S. aureus* y/o *S. epidermidis*, preferentemente SARM, o de cualquier otra fuente, tal como un cultivo bacteriano, añadir un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención a dicha muestra, permitir la unión de dicho anticuerpo o parte funcional del mismo de acuerdo con la invención a bacterias *S. aureus* y/o *S. epidermidis*, cuando están
10 presentes, y aislar bacterias de *S. aureus* y/o *S. epidermidis* unidas a un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención de dicha muestra.

Por lo tanto, ahora que se han proporcionado compuestos de unión específica a bacterias gram-positivas de acuerdo con la invención y secuencias de ácido nucleico codificantes, que incluyen compuestos de unión humana, se han
15 puesto a disposición aplicaciones terapéuticas mejoradas. Las bacterias gram positivas como *S. aureus* y/o *S. epidermidis* son contrarrestadas por compuestos de unión de acuerdo con la invención. Por lo tanto, un compuesto de unión de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para su uso como medicamento o agente profiláctico. Preferentemente, se usan compuestos de unión que consisten en secuencias humanas, o que tienen como máximo 5 % de secuencias no humanas, con el fin de reducir la posibilidad de efectos secundarios adversos
20 cuando se tratan individuos humanos. Por lo tanto, también se proporciona en el presente documento un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con la invención para su uso como medicamento y/o agente profiláctico. Cuando se administra un ácido nucleico de acuerdo con la invención, se traducirá *in situ* en un compuesto de unión de acuerdo con la invención. En una realización particularmente preferente, dicho anticuerpo comprende el anticuerpo F1, o una parte funcional del mismo. Dicho medicamento o agente profiláctico se usa preferentemente para contrarrestar o, al menos en parte, evitar una infección por *S. aureus* y/o *S. epidermidis* o para contrarrestar o,
25 al menos en parte, evitar los efectos adversos de una infección por *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. Por lo tanto, se proporciona además un anticuerpo o una parte funcional del mismo o una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención para su uso como medicamento y/o agente profiláctico para tratar y/o evitar al menos en parte una afección relacionada con *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. Ejemplos no limitantes de dichas afecciones son infecciones de la piel, granos, impétigo, flemones, foliculitis, celulitis, forúnculos, carbunclos, síndrome de la piel escaldada, abscesos, neumonía, meningitis, osteomielitis, endocarditis, síndrome de shock tóxico y septicemia. Preferentemente, la infección por *S. aureus* es contrarrestada o al menos en parte evitada. Lo más preferentemente, una afección relacionada con SARM se contrarresta, disminuye y/o al menos en parte se evita. Por lo tanto, también se proporciona un uso de un anticuerpo o una parte funcional del mismo o una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento y/o un agente profiláctico para tratar y/o evitar al
30 menos en parte *S. aureus* y/o *S. epidermidis*, así como un método para tratar o evitar al menos en parte una afección relacionada con *S. aureus* y/o *S. epidermidis*, comprendiendo el método administrar a un individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o una parte funcional de acuerdo con la invención, preferentemente después de que se haya diagnosticado que dicho individuo está infectado por *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. Dicha afección preferentemente comprende al menos una de las afecciones relacionadas con *S. aureus* enumeradas anteriormente, más preferentemente una afección relacionada con SARM.

Dicho anticuerpo comprende preferentemente el anticuerpo F1, o una parte funcional del mismo.

45 Con el fin de contrarrestar las bacterias gram-positivas, un compuesto de unión de acuerdo con la invención se administra preferentemente a un individuo antes de que haya tenido lugar una infección. Como alternativa, se administra un compuesto de unión de acuerdo con la invención cuando un individuo ya está infectado. Dicho compuesto de unión se administra preferentemente a individuos con un mayor riesgo de complicaciones, tales como, por ejemplo, individuos hospitalizados y/o individuos con inmunidad comprometida. También las personas mayores
50 tienen un mayor riesgo de afecciones bacterianas. Los compuestos de unión de acuerdo con la invención se administran preferentemente a través de una o más inyecciones. Los intervalos de dosificación de los compuestos de unión de acuerdo con la invención para usar en las aplicaciones terapéuticas como se ha descrito anteriormente en el presente documento están diseñados sobre la base de estudios de dosis crecientes en el ambulatorio en ensayos clínicos para los cuales existen requisitos de protocolo rigurosos. Las dosis típicas están entre 0,1 y 10 mg por kg de peso corporal. Para la aplicación terapéutica, los compuestos de unión de acuerdo con la invención se combinan normalmente con un vehículo, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de vehículos adecuados, por ejemplo, comprenden hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina sérica (*p. ej.*, BSA o RSA) y ovoalbúmina. En una realización preferente, dicho vehículo adecuado comprende una solución como, por ejemplo, solución salina.
60

En otra realización más, se usa un ácido nucleico que codifica un compuesto de unión de acuerdo con la invención. Como ya se ha descrito, tras la administración de dicho ácido nucleico, la maquinaria del huésped produce compuestos de unión. Los compuestos de unión producidos pueden evitar y/o contrarrestar la infección por bacterias gram-positivas y/o los efectos adversos de dicha infección. Por lo tanto, también se proporciona junto con la presente una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención para su uso como medicamento y/o agente profiláctico. Dicho ácido nucleico se usa preferentemente para contrarrestar *S. aureus* y/o *S. epidermidis*, más
65

preferentemente *S. aureus*, lo más preferentemente SARM. Por lo tanto, se proporciona además un uso de una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento y/o un agente profiláctico para tratar y/o evitar, al menos en parte, una afección relacionada con una bacteria gram-positiva. Dicha afección relacionada con una bacteria gram-positiva preferentemente comprende una infección por *S. aureus* y/o *S. epidermidis*, más preferentemente una infección por *S. aureus*, lo más preferentemente una infección por SARM.

Se proporciona además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o una parte funcional del mismo o una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica es preferentemente adecuada para uso humano.

La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que sirven simplemente para aclarar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

MÉTODOS

20 Aislamiento de células B

Las células B se obtuvieron a partir de sangre fresca de adultos mediante separación de Ficoll y selección negativa de CD4/CD8 con microperlas de MACS como se describe por el fabricante (Miltenyi Biotech). Para obtener células B de memoria, las células se clasificaron para CD19⁺CD3⁻CD27⁺IgA⁻ en un FACSaria (Becton Dickinson). El uso de estos tejidos fue aprobado por los comités de ética médica de la institución y dependía del consentimiento informado. Los donantes se seleccionaron basándose en la carga de cepas SARM adquiridas en el hospital con el grupo genotipo 109 y 16.

30 Cultivo de células

Las células B mantenidas en medio de cultivo convencional que contiene IMDM (Gibco), FBS al 8 % (HyClone) y penicilina/estreptomina (Roche) se co-cultivaron en fibroblastos de células L de ratón irradiados con (γ) (50Gy) que expresan de forma estable CD40L (células CD40L, 10⁵ células/ml) e IL-21 de ratón recombinante (25 ng/ml, sistemas I+D). Se usó rhIL-4 (I+D) a 50 ng/ml. Las células se probaron de forma habitual mediante PCR y se encontraron negativas para la presencia de micoplasma y EBV (datos no mostrados).

Las células B de memoria humana transducidas en masa doblemente positivas para NGFR y GFP se purificaron mediante clasificación de células FACS y se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 500 células por pocillo. Los sobrenadantes de cultivo se probaron en ELISA usando lisados bacterianos de las cepas Newman y SH1000. Los cultivos positivos se subclonaron a una densidad celular de 10 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se probaron nuevamente mediante ELISA. Posteriormente, los cultivos positivos se sembraron a 1 célula por pocillo y se probaron nuevamente mediante ELISA para determinar su reactividad contra las cepas de *S. aureus*, Newman y SH1000.

45 Trasducción retroviral

La construcción retroviral BCL6 se ha descrito anteriormente (Shvarts A. y col., Genes Dev 16, 681-686 (2002)). El Dr. Stanley Korsmeyer proporcionó amablemente ADNc que codifica Bcl-xL humano. BCL6 y Bcl-xL se clonaron por separado en un BCL6-NGFR y una construcción BclxL-GFP. Estas construcciones se transfectaron en las células de empaquetado retroviral LZRS, Phoenix como se describió anteriormente (Jaleco AC y col., Blood 94, 2637-2646 (1999), Scheeren FA y col., Nat Immunol 6, 303-313 (2005)). Las células B de memoria se transdujeron doblemente por el BCL6 y el Bcl-xL que contienen retrovirus después de la activación en células CD40L-L en presencia de rmlL-21 durante 36 horas como se ha descrito anteriormente (Diehl SA y col., J. Immunol 180, 4805-4815 (2008), Kwakkenbos M. y col., Nat Med in press (2009)). Las células transducidas se mantuvieron en células CD40L-L con rmlL-21.

ELISA

Para determinar el contenido de anticuerpo, las placas de ELISA se recubrieron con IgG antihumana (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a 5 µg/ml en PBS durante 1 h a 37 °C o durante una noche a 4 °C y se lavaron en tampón de lavado ELISA (PBS, Tween-20 al 0,5 %). Se usó leche al 4 % en PBS como agente bloqueante, antes de que se añadiera la dilución en serie de sobrenadantes de cultivo celular y un anticuerpo de detección conjugado con enzima (dilución 1:2500 para anti-IgG conjugada con HRP (Jackson)). Se usó sustrato TMB/solución de parada (Biosource) se usó para el desarrollo de los ELISA.

Para fines de tamizado, los investigadores usaron lisados de las cepas Newman y SH1000. Ambos se fabricaron en

PBS y se recubrieron directamente a 5 a 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ antes de que los sobrenadantes de cultivo de células B se probaran sin diluir o a 1:2.

5 Para explorar la especificidad de antígeno del clon F1 de IgG1 humana, se desarrolló un ELISA de detección de ALT. Se añadieron preparaciones ALT purificadas de *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. faecalis* y *S. pyogenes* (Sigma) a placas ELISA recubiertas con anti-ALT de ratón purificado IgG policlonal (1/200 stock 1 mg ml^{-1} , QED Bioscience), antes de añadir anticuerpos secundarios.

10 Además, los investigadores probaron varias preparaciones de ALT procedentes de una biblioteca desarrollada por W. Fischer (Institut für Biochemie, Univ de Erlangen, Alemania) y amablemente proporcionadas por B. Appelmelk (VU, Amsterdam, Holanda) (véase para más detalles (Keller R y col., Infect Immun 60, 3664-3672 (1992), Polotsky VY y col., Infection and Immunity 64, 380-383 (1996) y Greenberg JW y col., Infection and Immunity 64, 3318-3325 (1996)) y revisado en (Weidenmaier C. y col., Nat Rev Microbiol 6, 276-287 (2008)) en ELISA directos. Las preparaciones de ALT se recubrieron a 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ antes de añadirse rF1 (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) o anticuerpos de control (dilución 1:5 de sobrenadante de hibridoma) y se detectaron adicionalmente con anticuerpos antihumanos o de ratón conjugados. El estudio de panel de las preparaciones de ALT purificadas incluía: *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. lactis*, *L. garvieae*, *B. bifidum*, *M. luteus*, *L. casei*, *L. mesenteroides*, *B. licheniformis*, *L. welshimeri*, *E. hirae*, *L. raffinolactis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*. Varias variantes contienen o carecen de restos de alanina y/o anclajes lipídicos (no representados en este ejemplo).

20 Unión del anticuerpo F1 a los cultivos bacterianos

25 Se usó la cepa Newman de *S. aureus* y la cepa de *S. pneumoniae* (serotipo 3). Newman se cultivó en TSH 50 ml durante una noche, luego se resuspendió 1 ml en 100 ml durante 2 a 2,5 horas hasta DO: 1 y se recogieron las bacterias. *S. pneumoniae* se cultivó en medio Todd Hewitt mezclado con medio de levadura. Antes, las bacterias se incubaron con anticuerpo F1, una IgG de control (D25, un anticuerpo humano anti-RSV) o solo con el anticuerpo secundario (solo IgG-PE), las células se trataron previamente con suero de ratón al 100 % para evitar la tinción de fondo. Después del lavado, se añadió el anticuerpo secundario (IgG-PE). Las incubaciones de anticuerpos se realizaron durante 20 min en hielo.

30 Determinación de la secuencia de F1 y clonación de expresión

35 Los investigadores aislaron el ARN total usando Trizol (Invitrogen), generaron ADNc usando superíndice TR, realizaron PCR y clonaron las regiones variables de cadena pesada y ligera en el vector de clonación pCR2.1 TA (Invitrogen). Para descartar mutaciones inducidas por la transcriptasa inversa o la ADN polimerasa, los investigadores realizaron varios experimentos de clonación independientes. Para producir mAAb F1 recombinante los investigadores clonaron regiones variables pesadas y ligeras de F1 en marco con regiones constantes de IgG1 y Kappa humanas en un vector basado en pcDNA3.1 (Invitrogen) y células 293T transfectadas transitoriamente. Los investigadores purificaron F1 recombinante del sobrenadante de cultivo con Proteína A.

40 RESULTADOS

Generación del clon F1

45 De tres sujetos que dieron positivo para SARM pero que no estaban enfermos, se recogieron 50-60 ml de sangre con heparina y se aislaron células B periféricas después de una etapa de purificación de ficoll. Las células B de varias poblaciones de células B se transdujeron doblemente con retrovirus que contenían BCL6-NGFR y Bch xL-GFP (Diehl y col., y Kwakkenbos y col.). A partir de la IgG, población positiva para CD27, se iniciaron mini-cultivos de células B policlonales en placas de 96 pocillos con una densidad celular de 500 células/pocillo. Se recogió el sobrenadante de estos mini-cultivos y se usó en ELISA para detectar la presencia de anticuerpos IgG específicos de *S. aureus* (en estos ELISA el recubrimiento fue lisados celulares de dos cepas de *S. aureus*, SH1000 y Newman. Los mini-cultivos que fueron seleccionados positivos tanto en la SH1000 como en la Newman. *S. aureus* se sembró en nuevos mini-cultivos a una densidad de 10 células/pocillo. De nuevo, el sobrenadante de estos mini-cultivos se recogió y se tamizó en los ELISA SH1000 y Newman. Los clones que se seleccionaron como positivos en ambos ELISA se sembraron en cultivos monoclonales (es decir, 1 célula/pocillo). Después de probar el sobrenadante de estos cultivos monoclonales, se encontró que un clon (llamado F1) producía anticuerpos IgG monoclonales específicos de *S. aureus*.

Anticuerpos en el sobrenadante del clon F1 se unen a preparaciones de ALT de *S. aureus*

60 Al generar el clon F1, los investigadores ya encontraron que el sobrenadante de F1 se unía a los lisados de células bacterianas de dos cepas de *S. aureus*, SH1000 y Newman. El principal compuesto de la pared celular de bacterias gram-positivas es ALT, y por lo tanto, los investigadores decidieron probar la unión del sobrenadante de F1 con preparaciones de ALT de *S. aureus* en un ELISA. Como se muestra en la Tabla 1, el sobrenadante del clon F1 se une a lisados de células bacterianas de la cepa SH1000 y Newman de *S. aureus*, pero también se adquirieron en el mercado preparaciones ALT de *S. aureus* purificadas. Sin embargo, los investigadores observaron que la unión a las

preparaciones ALT fue significativamente menor que la observada con bacterias completas.

Tabla 1: Sobrenadante del clon F1 se une a preparaciones ALT de *S. aureus*. Como control negativo, se usó un anticuerpo secundario conjugado con HRP anti-ratón. Otro control fue un anticuerpo de virus anti-gripe que solo detectaba la proteína H3 del virus de la gripe.

	Clon F1	Ratón anti-ALT	Control anti-gripe
SH1000		1,004	-0,010
Newman		0,753	-0,007
SA ALT ^(sigma)		0,176	-0,005
H3 del virus de la gripe		0,003	-0,002
Sin recubrimiento		-0,013	-0,014
			-0,007
			0,007
			-0,009
			1,523
			-0,015

Anticuerpo F1 recombinante producido se une a preparaciones ALT de múltiples fuentes

Después de clonar los genes del anticuerpo en vectores de expresión y producir el anticuerpo F1 (rF1) recombinante en un sistema de expresión, el anticuerpo rF1 se probó en preparaciones de ALT purificadas de varias bacterias. Como se muestra en la Figura 2A, el anticuerpo rF1 se une bien a muestras comerciales de ALT obtenidas de *S. aureus* y *B. subtilis*, y un poco menos profundamente a muestras de ALT de *S. faecalis* y *S. pyogenes*. El anticuerpo rF1 no se unió a una muestra de ALT de *S. pneumoniae* (datos no mostrados). Además, rF1 reconoció muestras de ALT altamente purificadas de *B. subtilis*, *B. licheniformis* y dos aislados de *S. aureus* (Figura 2b). rF1 no se unió a preparaciones de ALT de *S. mutans* (Fig. 2b) o de *L. lactis*, *L. garvieae*, *B. bifidum*, *M. luteus*, *L. casei*, *L. mesenteroides*, *L. welshimeri*, *E. hirae*, *L. raffinolactis*, *S. mutans* y *S. pneumoniae* (resultados no mostrados).

Anticuerpo F1 recombinante se une a bacterias vivas de *S. aureus*

Con el fin de estudiar si el anticuerpo rF1 también reconocería bacterias gram-positivas vivas, se probó la unión del anticuerpo rF1 a *S. aureus* y *S. pneumoniae* usando citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 3A, el anticuerpo rF1 se une a bacterias vivas de *S. aureus* (cepa Newman), pero no a *S. pneumoniae*. Además, los investigadores mostraron que rF1 reconoció 6 aislados clínicos de *S. aureus*; uno es una cepa patógena que es positiva para PVL, 3 cepas regulares y 2 cepas de SARM (Figura 3b).

Ejemplo 2

MÉTODOS

Cepas y cultivos de bacterias.

Las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM) USA300 (1114), USA400, N315, USA100, USA1000, COL, MRSA252, así como las cepas de *S. aureus* sensibles a la meticilina (SASM) Reynolds, Becker, Smith Diffuse, MN8, y la cepa Mu50 sensible al compuesto intermedio de vancomicina (SAIV), se obtuvieron todas de la Red de resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* (NARSA); Las cepas de SASM Newman y Rosenbach eran de ATCC. *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, y *Streptococcus pyogenes* se obtuvieron en Ward's Natural Science; *Listeria monocytogenes* era de ATCC. Las bacterias se cultivaron en placas de agar de soja tríptica (TSA) complementadas con 5 % de sangre de oveja durante 18 h a 37 °C. Para los cultivos líquidos, se inocularon colonias individuales de placas de TSA en caldo de soja tríptica (TSB) y se incubaron a 37 °C mientras se agitaba a 200 rpm durante 18 h. Las diluciones frescas con factor de dilución de 100 de estos cultivos en TSB fresco se subcultivaron adicionalmente durante varias veces.

Análisis FACS de la unión de rF1 a bacterias completas cultivadas *in vitro*.

Para la tinción de anticuerpos de células completas, se recogieron bacterias de placas de TSA o cultivos de TSB, y se lavaron con solución salina tamponada de Hank (HBSS) sin rojo de fenol suplementado con ASB al 0,1 % (sin IgG; Sigma) y Hepes 10 mM, pH 7,4 (tampón HB), por centrifugación a 1700 x g durante 20 min. Las concentraciones bacterianas se estimaron mediante la lectura de la densidad óptica a 630 nm. Las suspensiones bacterianas de 20x10⁹ CFU/ml en tampón HB se mezclaron con volúmenes iguales de 300 µg/ml de IgG de conejo (Sigma), y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente (TA) para bloquear la unión de IgG no específica. Los anticuerpos primarios, que incluyen rF1 y un control de isotipo IgG1 humana, se añadieron a una concentración final de 2 µg/ml, y estas mezclas se incubaron durante 15 min a TA. Después de dos lavados con HB, los sedimentos bacterianos se resuspendieron en una solución de anticuerpos secundarios de IgG antihumana fluorescentes (Jackson ImmunoResearch) y se incubaron durante 15 minutos a TA. Las bacterias se lavaron dos veces con PBS, se resuspendieron en PBS con paraformaldehído al 1 % y se analizaron mediante citometría de flujo.

Análisis FACS de la unión de rF1 a bacterias completas de tejidos infectados.

Para el análisis de la unión del anticuerpo a las bacterias del tejido infectado, se lavaron subcultivos de USA300 de 4 h en TSB con PBS. Se inyectó a los ratones por vía intravenosa 100 μ l de una suspensión de USA300 en PBS con una concentración estimada de 10×10^8 CFU/ml. Tres días más tarde, los riñones, los hígados y los pulmones se recogieron y se homogeneizaron usando tubos de molienda de tejido cónico (VWR). Cuando se indicó, los órganos se recogieron en diferentes momentos de la infección. Para lisar células de ratón, los homogeneizados se incubaron durante 10 minutos a TA en PBS que contenía Triton-X100 al 0,1 % (Thermo), 10 μ g/ml de DNaseI (Roche) y cóctel de inhibidor de proteasa Complete Mini (Roche), y se pasaron por un filtro de 40 μ m (Falcon). Las suspensiones celulares se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en tampón HB, se mezclaron con volúmenes iguales de 600 μ g/ml de IgG humana (Sigma) y se incubaron durante 1 h a TA. Los anticuerpos primarios, que incluyen rF1 y un control de isotipo IgG1 humana, se añadieron a una concentración final de 2 μ g/ml. Para diferenciar bacterias de residuos de órganos de ratón, se añadió IgG de conejo anti *S. aureus* (Abcam) a una concentración de 20 μ g/ml. Después de la incubación durante 15 min a TA, las células se lavaron dos veces con tampón HB y se resuspendieron en una mezcla de anticuerpos IgG secundarios anti-IgG humana y anti-IgG de conejo, cada uno marcado con un fluorocromo diferente (Jackson ImmunoResearch). Después de dos lavados con PBS, las células se resuspendieron en PBS con paraformaldehído al 2 % y se analizaron mediante citometría de flujo. Después de seleccionar las bacterias de parcelas de doble fluorescencia marcando para tinción positiva con anti- *S. aureus* de IgG de conejo, se generaron diagramas de histograma de superposición de intensidades de fluorescencia de rF1 y control de isotipo.

RESULTADOS

rF1 se une fuertemente a 14 cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis*

Se probaron siete cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM), seis cepas de *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM), una cepa de *S. aureus* sensible al compuesto intermedio de vancomicina (SAIV), *S. epidermidis* y varias especies gram positivas diferentes para la unión al anticuerpo rF1. Como se muestra en la Figura 4, rF1 se une fuertemente a las 14 cepas de *S. aureus* (Figura 4A) y a *S. epidermidis* (Figura 4B), pero no a las otras especies gram positivas probadas (Figura 4B).

rF1 se une a SARM de diferentes etapas de crecimiento y de infección *in vivo*

Los investigadores probaron la capacidad de mAb rF1 para unirse a bacterias en diferentes tejidos y en el transcurso de la infección. Los investigadores encontraron que rF1 se unía a bacterias aisladas de riñón, hígado y tejido pulmonar murino dos días después de la infección y que la unión a bacterias aisladas de riñones infectados era estable, uniéndose a bacterias 2, 3 y 8 días después de la infección.

Se probó la unión del anticuerpo rF1 a diferentes etapas de crecimiento de SARM (cepa USA300), concretamente crecimiento logarítmico temprano (2 horas) y crecimiento posterior exponencial (8 horas) en cultivos de TSB, y crecimiento de colonias sólidas en placas de TSA. rF1 se une fuertemente a todas las etapas de crecimiento probadas (Figura 5A).

La unión del anticuerpo rF1 en SARM (cepa USA300) a bacterias completas de tejido infectado se probó en riñones homogeneizados de ratones tres días después de que los ratones se infectaran sistémicamente con SARM. Como se muestra en la Figura 5B, rF1 se une a SARM obtenida de tejido infectado.

Ejemplo 3

Se realizaron experimentos adicionales para identificar el epítipo unido por el anticuerpo rF1. Aunque se había observado la unión a preparaciones de ALT (véase, *p. ej.*, el Ejemplo 1), esa unión no era tan consistente como la unión a bacterias completas, lo que sugiere que puede estar implicado otro epítipo en la unión de rF1.

MÉTODOS

Inmunoprecipitación, transferencia Western y espectrometría de masas de lisados de pared celular de *S. aureus* y *S. epidermidis* y preparación de WTA comercial

Se dividieron 40 microgramos de una preparación comercial de ácido teicoico de pared (WTA) de la cepa Wood46 de *S. aureus* (Biodesign/Meridian Life Sciences, Maine) en dos partes y se inmunoprecipitaron con 1 μ g/ml de rF1 o anticuerpo humano de control de isotipo. Los anticuerpos se capturaron con Protein A/G Ultralink Resin (Pierce). Las muestras se trataron luego con ditiotreitól 50 mM, 2-yodoacetamida 10 mM y se corrieron en un gel de Tris-glicina al 8 % y posteriormente se sometieron a transferencia Western con rF1.

Se preparó una preparación de pared celular de un cultivo de una noche de 20 ml de la cepa USA300 de *S. aureus* mediante el tratamiento del cultivo (40 mg de sedimento celular/ml) con 100 mg/ml de lisostafina en tampón de

rafinosa al 30 % a 37 °C durante 30 minutos. Toda la preparación de la pared celular se filtró, se diluyó hasta 10 ml con tampón de lisis NP40 y se incubó dos veces con agarosa M2 anti-Flag (Sigma) para reducir la mayor cantidad posible de proteína A de la preparación de la pared celular. La preparación final de la pared celular se dividió en dos partes y se inmunoprecipitó con 1 ug/ml de rF1 o anticuerpo humano de control de isotipo. Los anticuerpos se capturaron con Protein A/G Ultralink Resin (Pierce). Las muestras se trataron luego con ditiotreitól 50 mM, 2-yodoacetamida 10 mM y se corrieron en un gel de Tris-glicina al 8 % y posteriormente se tiñeron con plata o se sometieron a transferencia Western con rF1.

Se prepararon lisados de un cultivo de una noche de 20 ml de *Staphylococcus epidermidis* mediante batido con perlas en tampón de lisis NP40. La preparación de lisado resultante se diluyó a 10 ml con tampón de lisis NP40, se dividió en dos partes y se inmunoprecipitó con 1 ug/ml de rF1 o anticuerpo de control. Los anticuerpos se capturaron con Protein A/G Ultralink Resin (Pierce). Las muestras se trataron luego con ditiotreitól 50 mM, 2-yodoacetamida 10 mM y se corrieron en un gel de Tris-glicina al 8 % y posteriormente se tiñeron con plata o se sometieron a transferencia Western con rF1.

Para el análisis proteómico, las muestras se aplicaron a un mini gel SDS PAGE prefabricado y las proteínas resueltas se tiñeron con azul de Coomassie. Se cortaron y redujeron las rodajas de gel de la región del gel correspondiente a las bandas visualizadas mediante transferencia Western de rF1, se alquilaron con yodoacetamida y se digirieron *in situ* con tripsina. Los péptidos tripticos resultantes se analizaron por espectrometría de masas en tándem con nanoelectropulverización de cromatografía líquida de fase inversa microcapilar en un espectrómetro de masas de resonancia ión ciclotrón con transformada de Fourier de trampa iónica lineal híbrida (LTQ-FT; Thermo Fisher) en un experimento dependiente de datos. Los resultados del espectro de masas en tándem se presentaron para la búsqueda de bases de datos usando el software Mascot (Matrix Science).

25 **Expresión de ClfA exógena expresada en *S. aureus* y *E. coli***

Expresión de S. aureus de ClfA marcada con His: El gen del factor de aglutinamiento A (ClfA) se amplificó por PCR a partir de la secuencia que codifica la secuencia señal hasta la secuencia que codifica la glicina en el motivo LPXTG del ADN genómico USA300. Una etiqueta His c-terminal se diseñó por ingeniería genética en el extremo del motivo LPXTG y se ligó en el vector de expresión pTet de *S. aureus* (pSAS10 de Genentech). La construcción resultante se sometió luego a electroporación en WT RN4220 de *S. aureus*. Se inoculó un cultivo de 20 ml del RN4220 electroporado o RN4220 vacío (que no lleva un vector de expresión pTet) de un cultivo de una noche (DO₆₀₀ inicial de 0,15), se cultivó durante 1 h en caldo de soja triptica (TSB) y luego se indujo la expresión de la proteína durante 2 h con anhidrotetraciclina (200 ng/ml). Al final del periodo de inducción, el cultivo de *S. aureus* se lisó previamente con lisostafina (50 ug/ml) y luego se lisó adicionalmente mediante batido con perlas en tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7,5, tritón-X al 1 % y comprimidos de inhibidor de proteasa de Roche sin EDTA). Los lisados aclarados se incubaron luego con resina NiNta (Qiagen) en presencia de Imidazol 10 mM durante 1 h a 4 °C para reducir la proteína recombinante ClfA.

Expresión de E.coli de ClfA marcada con His: El gen del factor de aglutinamiento A (ClfA) se amplificó por PCR a partir de la secuencia que codifica la secuencia señal N-terminal (con la metionina de inicio) hasta la secuencia que codifica la glicina en el motivo LPXTG C-terminal del ADN genómico de USA300. El producto de PCR amplificado se ligó luego en marco con una etiqueta His c-terminal en el vector de expresión pET 21b(+) de *E. coli* (Novagen). La construcción resultante se transformó en células competentes BL21-gold (DE3) de *E. coli* (Stratagene) y se indujo para la expresión de la proteína durante 3,5 h con IPTG de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cultivo de *E. coli* inducido se lisó mediante batido con perlas en tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 7,5, tritón-X al 1 % y comprimidos de inhibidor de proteasa de Roche sin EDTA). Los lisados aclarados se incubaron luego con resina NiNta (Qiagen) en presencia de Imidazol 10 mM durante 1 h a 4 °C para reducir la proteína recombinante ClfA.

50 **Expresión de ClfA exógena expresada en *E. coli* e incubación con lisado de *S. aureus***

Expresión y purificación de las proteínas SDR de superficie celular de S. aureus ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE en E.coli: Los genes ClfA, ClfB, SdrC, SdrD y SdrE se amplificaron por PCR a partir de la secuencia que codifica el inicio maduro de la proteína hasta la secuencia que codifica la glicina en el motivo LPXTG a partir de ADN genómico USA300 y se ligaron en marco con una etiqueta de Unizyme N-terminal en el vector ST239 (Genentech). Las construcciones se transformaron en *E.coli* 58F3 (Genentech), se indujeron para la expresión de proteínas y posteriormente se purificaron.

Captura NiNta de proteínas SDR marcadas con NT Unizyme: 500 ug de proteínas SDR purificadas marcadas con Unizyme N-terminal (ClfA, ClfB, SdrC, SdrD, SdrE) se diluyeron en PBS que contenía inhibidores de proteasa (sin EDTA) y se incubaron con resina NiNta (Qiagen) durante 1,5 h a 4 °C. La resina NiNta con la proteína SDR capturada marcada con Unizyme se lavó entonces una vez con tampón (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM; pH 8,0).

Modificación de proteínas SDR producidas por E. coli mediante lisado de S. aureus: Se inició un cultivo de 25 ml de un cultivo de una noche de ΔPan Sdr mutante (ClfA-ClfB-SdrCDE-nulo, obsequio de Tim Foster, Trinity College Dublin) Newman de *S.aureus* (DO₆₀₀ inicial de 0,15) y se cultivó en TSB durante 3 h (fase exponencial) 37 °C,

200 rpm. El cultivo de fase exponencial se resuspendió luego en 1 ml de PBS y se lisó con 200 ug/ml de lisostafina en presencia de 250 unidades de Benzonase Nuclease (Novagen) a 37 °C durante 30 minutos. Los lisados se aclararon de residuos centrifugando a velocidad máxima en una microcentrífuga durante 10 minutos a 4 °C. La modificación de la proteína SDR *E.coli* capturada con NiNTa se llevó a cabo mediante la incubación con lisados ΔPan Sdr mutantes aclarados de *S. aureus* durante 1 h a 37 °C.

Transferencia Western de la proteína SDR de E. coli modificada: Las muestras de la proteína SDR *E.coli* modificada o no modificada capturada con NiNTa se lavaron luego 3 veces con tampón de lavado (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM; pH 8,0), se prepararon para transferencia Western y se corrieron con un gel Tris glicina al 8 % (Invitrogen). Las transferencias Western se transfirieron con el anticuerpo rF1 o con un anticuerpo anti-Unizyme (Genentech).

Identificación del dominio SDR como antígeno para rF1

Expresión de *S. aureus* de construcciones MBP-SD: El gen de la proteína de unión a maltosa (MBP) se amplificó por PCR del vector pMAL-c5x (New England BioLabs [NEB], Ipswich, Mass, EE.UU.) a partir de la secuencia que codifica el inicio de la proteína madura hasta la secuencia que codifica el extremo del sitio de escisión del factor Xa. Las longitudes variables de SD marcada con His c-terminal (SD, SDS, DSD, SDDS, SDDSD, SDDSDSD) se sintetizaron como oligonucleótidos monocatenarios y se hibridaron juntos para formar ADN bicatenario. La región Sdr del gen ClfA se amplificó por PCR a partir de la secuencia que codifica el comienzo (560D) de la región Sdr y se incluyó hasta la secuencia que codifica 618A o 709S de la región SD seguida de la secuencia de adn que codifica una etiqueta His de los plásmidos respectivos pTet.ClfA.SD618A o pTet.ClfA.SD709S (Genentech). Como control, la secuencia que codifica el dominio A del gen ClfA desde el comienzo de la proteína madura hasta la secuencia que codifica el extremo del dominio A (538G) seguida de la secuencia que codifica una etiqueta His se amplificó por PCR a partir del plásmido pTet.ClfA.Adom.538G (Genentech). El inserto MBP junto con uno de los diversos insertos SD o el dominio ClfA A se ligaron en el vector de expresión pTet de *S.aureus* (pSAS10 de Genentech). Las construcciones resultantes se sometieron luego a electroporación en la cepa de *S. aureus* RN4220 Δ sortasa (cepa mutante por eliminación de sortasa en el fondo RN4220).

Se inoculó un cultivo de 20 ml de RN4220 Δ sortasa electroporada o RN4220 Δ sortasa vacía (que no portaba un vector de expresión pTet) de un cultivo de una noche (DO₆₀₀ inicial de 0,15), se cultivó durante 1 h en caldo de soja triptica (TSB) suplementado con glucosa (2 g/l) y luego se indujo para la expresión de la proteína durante 2 h con anhidrotetraciclina (200 ng/ml). Al final del periodo de inducción, el cultivo de *S. aureus* se resuspendió en tampón de columna (NaCl 150 mM, Tris 20 mM pH 7,5 y comprimidos de inhibidores de proteasa Roche sin EDTA) y se lisaron con 200 ug/ml de lisostafina en presencia de 250 unidades de Benzonase nucleasa (Novagen) a 37 °C durante 30 minutos. Los lisados se aclararon de residuos centrifugando a velocidad máxima en una microcentrífuga durante 10 minutos a 4 °C. Los lisados aclarados se incubaron luego con resina de amilosa (NEB) junto con una concentración final de EDTA de 1 mM durante 1,5 h a 4 °C para capturar las proteínas MBP-SD expresadas.

Transferencia Western de construcciones MBP-SD expresadas por S. aureus: La resina de amilosa con las proteínas MBP-SD capturadas se lavaron tres veces con tampón de columna, se preparó adicionalmente para el análisis de transferencia Western y se corrió en un gel de Tris-glicina al 8 %. Las transferencias de Western se transfirieron con el anticuerpo rF1, un anticuerpo anti-penta His (Qiagen) o un anticuerpo anti-MBP (NEB).

RESULTADOS

rF1 reacciona a una familia particular de proteínas SDR (Ser-Asp-Repeat) en *S. aureus* y *S. epidermidis*

Una preparación comercial de ácido teicoico y lisado de pared celular (WTA) de *S. aureus* (cepa USA300) se probó para determinar la unión a rF1 después de la inmunoprecipitación. rF1 se une a varios componentes de la preparación de ácido teicoico comercial (Figura 6A, panel izquierdo) y del lisado de la pared celular de *S. aureus* (Figura 6B, panel izquierdo). Usando espectrometría de masas, estos componentes de la preparación de WTA y el lisado de la pared celular se identificaron como ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD y SdrE (Figura 6A, panel derecho y Figura 6B, panel derecho)

Un lisado de pared celular de *S. epidermidis* se probó para determinar la unión a rF1 después de la inmunoprecipitación. La Figura 6C (panel izquierdo) muestra la unión de rF1 a varios componentes de un lisado de pared celular de *S. epidermidis*. Estos componentes no se identificaron con un anticuerpo de control. Usando espectrometría de masas, estos componentes de la pared celular se identificaron como SdrF, SdrG y SdrH (Figura 6C, panel derecho).

Expresión de ClfA exógena en *S. aureus* y *E.coli*

La ClfA exógena expresada en *S. aureus* es reactiva a rF1, mientras que la ClfA expresada en *E. coli* no lo fue (Figura 7A). Sin embargo, la incubación de las proteínas Sdr ClfA (SdrA), ClfB (SdrB), SdrC, SdrD y SdrE expresadas en *E. coli* con el lisado de *S. aureus* recuperó la reactividad de rF1 (Figura 7B).

rF1 se une a dominios SDR expresados en *S. aureus*

El anticuerpo rF1 se une a las regiones Sdr de ClfA que consisten en la ClfA 560D-618S y la ClfA 560D-709S (Figura 8) expresadas en *S. aureus*. rF1 no se une al dominio A de ClfA o a secuencias peptídicas pequeñas que consisten en hasta tres repeticiones SD.

Ejemplo 4

MÉTODOS

Clonación de las regiones variables de rF1 en el vector pRK

La Phusion ADN polimerasa, las enzimas de restricción EcoRV, KpnI, PvuII, ApaI, AgeI, y AhdI y la T4 ADN ligasa se adquirieron en New England BioLabs, Ipswich, MA, EE. UU. La Pfu ADN polimerasa, el kit de mutagénesis Quick change II dirigido al sitio se adquirió en Stratagene/Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE. UU. Se adquirió gel de agarosa al 2 % en Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU. Los vectores pRK pRK.LPG3.HuKappa y pRK.LPG4.HumanHC se obtuvieron en Genentech/Roche, San Francisco del sur, California, EE. UU.

Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de rF1 Mab de los vectores pCPEO se colocaron en los vectores de expresión pRK de mamíferos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un volumen total de 50 µl usando Pfu ADN polimerasa de acuerdo con los procedimientos de PCR convencionales. V_H se amplificó con los cebadores YiHCF 5'-ATG GCT GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT G-3' (SEQ ID NO:18) y YiHCR2 5'-GAA CAC GCT GGG GCC CTT GGT GCT GGC ACT CGA GAC TGT GAC CAG GGT GCC AGG T*CC CCA G-3' (SEQ ID NO:19) (los sitios de restricción de PvuII y ApaI están subrayados y el * indica el cambio de un solo nucleótido de G a T para eliminar el sitio ApaI interno) y V_L se amplificó con los cebadores YiLCF 5'-CGG CTC GAC CGA TAT CCA GCT GAC CCA GAG-3' (SEQ ID NO:20) y YiLCR 5'-GAT TTC CAG CTT GGT ACC CTG GCC G-3' (SEQ ID NO:21) (el EcoRV y el KpnI están subrayados). Los productos particulares de PCR con 393 (V_H) y 328 (V_L) bp, respectivamente, fueron digeridos directamente por PvuII y ApaI para V_H, EcoRV y KpnI para V_L, seguido de purificación de gel (Invitrogen, Catálogo n.º K2100-12). V_H y V_L se ligaron individualmente en fragmentos de vector pRK de pRK/PvuII, ApaI para cadena pesada y pRK/EcoRV, KpnI para cadena ligera usando T4 ADN ligasa. Los plásmidos de ADN se confirmaron mediante patrones de digestión con enzimas de restricción, es decir, rF1V_H liberado ~300 bp y bandas de 5,8 kb por AgeI, mientras que rF1V_L mostró bandas de 2,3 y 3,1 kb por AhdI en gel de agarosa al 2 %.

Prueba de estrés químico

Al comparar los datos de secuencias primarias de anticuerpos con eventos de degradación observados experimentalmente, queda claro que determinados motivos de secuencia pueden ser propensos a la degradación (es decir, isomerización de aspartato en secuencias DD, DG y DS y desamidación de asparagina en secuencias NG). Si aparece dicho "punto caliente" de degradación en la CDR de un anticuerpo, la unión y la potencia pueden verse negativamente afectadas. Para moléculas que contienen puntos calientes, la prueba de estrés químico proporciona una forma de evaluar la susceptibilidad de estos motivos a la degradación colocando el anticuerpo en un tampón de formulación de plataforma y comparando una muestra de control con una sometida a estrés a 40 °C durante dos semanas. Si se observa degradación, la secuencia primaria puede rediseñarse por ingeniería genética para eliminar el punto caliente.

Después de que la muestra se somete a estrés durante dos semanas a 40 °C, se realizan diversos ensayos analíticos para evaluar dónde y cuánto se produjo de degradación. Se realizó un análisis de enfoque isoelectrico capilar (icIEF) para examinar las variantes de carga y se verificó la masa de anticuerpo intacta y reducida usando espectrometría de masas, y se realizó un mapa de péptido CL-EM/EM para obtener información de degradación específica de sitio.

Mutagénesis

Los plásmidos rF1 pRK experimentaron una serie de mutagénesis dirigida al sitio para estabilizar el rF1 Mab por N (AAC) 53S (AGC) en CDR2 de cadena pesada con el uso de FHV 5'-GGT GGC CAG CAT CAA CAG CGG CAA CAA CCC CTA CTA CG-3' (SEQ ID NO:22) and RHV 5'-CGT AGT AGG GGT TGT TGC CGC TGT TGA TGC TGG CCA CC-3' (SEQ ID NO:23) (el sitio de mutagénesis está subrayado) mediante el kit Quick change II dirigido al sitio. La variante de la mutagénesis fue secuenciada.

RESULTADOS

La secuencia primaria del anticuerpo rF1 contenía un sitio de desamidación de asparagina potencial en la cadena ligera CDR2: NNGNN (SEQ ID NO: 24). La prueba de estrés reveló un aumento de la desamidación en muestras estresadas en N53 (numeración de acuerdo con Kabat, 1991). La mutagénesis dirigida al sitio se realizó para estabilizar la sustitución de rF1 Mab por N (AAC, (SEQ ID NO: 25)) a 53S (AGC, (SEQ ID NO: 26)) en la cadena

pesada CDR2. La secuenciación de la variante de mutagénesis confirmó una mutación N53S.

Ejemplo 5

5 Desarrollo de variantes de Cys para aplicaciones de conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC)

Los plásmidos rF1 pRK se sometieron a una serie de mutagénesis dirigida al sitio con oligos de F1pRK.LC(205/210)VCF (468075) 5'-GGG CCT GAG CTC GCC CTG CAC AAA GAG CTT CAA CAG-3' (SEQ ID NO:27) y rF1pRK.LC(205/210)VCR (468076) 5'-CTG TTG AAG CTC TTT GTG CAG GGC GAG CTC AGG CCC-3' (SEQ ID NO:28) (El mutante Cys está subrayado) para generar los enlazadores de cadena ligera de rF1 thioMab, y rF1pRK.HCN53S.A121CF (468464) 5'-CTG GTC ACA GTC TCG AGT TGC AGC ACC AAG GGC CCA TC-3' (SEQ ID NO:29) y rF1pRK.HCN53S.A121CR (468465) 5'-GAT GGG CCC TTG GTG CTG CAA CTC GAG ACT GTG ACC AG-3' (SEQ ID NO:30) (El mutante Cys está subrayado) para formar los enlazadores de cadena pesada de rF1 thioMab mediante el método dirigido al sitio de Stratagene. La cadena ligera V205C y la cadena pesada A114C se confirmaron por secuenciación de las variantes (Figura 9).

Breve descripción de los dibujos

20 **Figura 1:** Secuencias de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo F1

25 **Figura 2:** El anticuerpo F1 se une a las preparaciones de ALT de varias bacterias gram-positivas. (a) Las preparaciones de ALT se obtuvieron de Sigma y se probaron en un ELISA de captura con un anti-ALT policlonal de ratón o (b) un conjunto altamente purificado de preparaciones de ALT obtenidas en W. Fischer. D25, un anticuerpo anti-RSV humano se usó como control negativo no específico y un anticuerpo anti-ALT monoclonal de ratón como control positivo.

30 **Figura 3:** El anticuerpo F1 recombinante se une a *S. aureus* pero no a *S. pneumoniae*. (a) Las bacterias se incubaron con anticuerpo F1, o una IgG control (D25, un anticuerpo anti-RSV humano) o sin el primer anticuerpo (solo IgG-PE). Después del lavado, se añadió el anticuerpo secundario (IgG-PE). (b) Se probaron 6 aislados clínicos en dos experimentos separados para la unión de F1. Se probó una cepa PVL+ (SA-1), 3 normales (SA-2 SA-3 y SA-4) y 2 cepas SARM (SA-5 y SA-6).

35 **Figura 4:** (a) Unión del anticuerpo rF1 a 14 cepas de *S. aureus*. (b) El anticuerpo rF1 se une a *S. epidermidis* pero no a *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* y *Streptococcus pyogenes*.

Figura 5: (a) El anticuerpo rF1 se une a SARM en diferentes etapas de crecimiento, IsoC: control de isotipo, Med: control de medios (b) El anticuerpo rF1 se une a SARM aislado de tejido infectado.

40 **Figura 6:** El anticuerpo rF1 se une a las proteínas SDR. (a) Inmunoprecipitación (IP) de una preparación comercial de ácido teicoico de *S. aureus* (cepa Wood 46) con rF1 o anticuerpo de control de isotipo, seguido de transferencia Western con anticuerpo rF1 (izquierda) y análisis por espectrometría de masas de fragmentos de la preparación de WTA unidos por el anticuerpo rF1 (derecha), (b) Inmunoprecipitación (IP) de lisado de pared celular de *S. aureus* (cepa USA300) con rF1 o anticuerpo de control, seguido de transferencia Western (WB) con anticuerpo rF1 (izquierda) y análisis por espectrometría de masas de fragmentos de la pared celular (cepa USA300) unidos por el anticuerpo rF1 (derecha) (c) Inmunoprecipitación del lisado de la pared celular de *S. epidermidis* con rF1 o anticuerpo de control de isotipo, seguido de transferencia Western con anticuerpo rF1 (izquierda), análisis por espectrometría de masas de fragmentos de la pared celular unidos por el anticuerpo rF1 (derecha).

50 **Figura 7:** Unión de rF1 a proteínas SDR expresadas en *S. aureus* y *E. coli*. (a) Transferencia Western de lisados de *S. aureus* y *E. coli* que contienen ClfA marcada con His sobreexpresada usando anticuerpos anti-His (izquierda) y rF1 (derecha). (b) Transferencia Western de lisados de células de *E. coli* que contienen ClfA, ClfB, SdrC, ClfB, SdrC, SdrD y SdrE marcadas con his tras la incubación con lisado de *S. aureus* con anticuerpo rF1 (parte superior) o anti-His (parte inferior).

55 **Figura 8:** rF1 se une a dominios SDR expresados por *S. aureus*. Construcciones expresadas por *S. aureus* y probadas para unirse a rF1 (izquierda), transferencias Western de lisados de *S. aureus* que contienen las construcciones expresadas con anticuerpo anti-MBP (proteína de unión a maltosa), anti-His y rF1 (derecha).

60 **Figura 9:** Secuencias de cadena pesada A114C (a) y cadena ligera V205C (b) variantes del anticuerpo rF1. Numeración de acuerdo con Kabat (1991), recuadros: CDR.

La Figura 9A divulga como SEQ ID NO 55, la secuencia de cadena pesada de rF1 y como SEQ ID NO 56, la secuencia de cadena pesada A114C de rF1.

65 La Figura 9A divulga como SEQ ID NO 57, la secuencia de cadena ligera de rF1 y como SEQ ID NO 58, la

secuencia de cadena ligera V205G de rF1.

Referencias

- 5 Diehl SA *y col.*, *J Immunol* 180, 4805-4815 (2008)
Greenberg JW *y col.*, *Infection and Immunity* 64, 3318-3325 (1996)
Jaleco AC *y col.*, *Blood* 94, 2637-2646 (1999)
Kabat *y col.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)
- 10 Keller R. *y col.*, *Infect Immun* 60, 3664-3672 (1992)
Kwakkenbos M *y col.*, *Nat Med* aceptado para la publicación (2009)
Moran *y col.*, *NEMJ* 355, 666-674 (2006)
Polotsky VY *y col.*, *Infection and Immunity* 64, 380-383 (1996)
- 15 Scheeren FA *y col.*, *Nat Immunol* 6, 303-313 (2005)
Shvarts A *y col.*, *Genes Dev* 16, 681-686 (2002)
Weidenmaier C *y col.*, *Nat Rev Microbiol* 6, 276-287 (2008)

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o una parte funcional del mismo que pueden unirse a una especie de *Staphylococcus*, que comprende:

- 5 (a) una secuencia de CDR1 de cadena pesada RFAMS (SEQ ID NO:1), y
- (b) una secuencia de CDR2 de cadena pesada SINNGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:2), y
- (c) una secuencia de CDR3 de cadena pesada DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO:3), y
- 10 (d) una secuencia de CDR1 de cadena ligera RASENVGDWLA (SEQ ID NO:4), y
- (e) una secuencia de CDR2 de cadena ligera KTSILES (SEQ ID NO:5), y
- (f) una secuencia de CDR3 de cadena ligera QHYXRFPTYT (SEQ ID NO:6), en la que X es I o M.

2. El anticuerpo o la parte funcional del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o la parte funcional del mismo comprenden:

- 15 (i) una secuencia de dominio variable de cadena pesada que comprende:
 - (a) un marco 1 (FW1) que tiene la secuencia de EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLS (SEQ ID NO: 38);
 - 20 (b) un marco 2 (FW2) que tiene la secuencia de WVRQAPGRGLEWVA (SEQ ID NO: 40);
 - (c) un marco 3 (FW3) que tiene la secuencia de RFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK (SEQ ID NO: 42); y
 - (d) un marco 4 (FW4) que tiene la secuencia de WGPGLTVTVSS (SEQ ID NO: 44);

y/o
(ii) una secuencia de dominio variable de cadena ligera que comprende:

- 25 (a) un marco 1 (FW1) que tiene la secuencia de DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC (SEQ ID NO: 48);
- 30 (b) un marco 2 (FW2) que tiene la secuencia de WYRQKPGKAPNLLIY (SEQ ID NO: 50);
- (c) un marco 3 (FW3) que tiene la secuencia de GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC (SEQ ID NO: 52); y
- (d) un marco 4 (FW4) que tiene la secuencia de FGQGTKLEIKRTV (SEQ ID NO: 54), o
- (a) un marco 1 (FW1) que tiene la secuencia de DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC (SEQ ID NO: 48);
- 35 (b) un marco 2 (FW2) que tiene la secuencia de WYRQKPGKAPNLLIY (SEQ ID NO: 50);
- (c) un marco 3 (FW3) que tiene la secuencia de GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC (SEQ ID NO: 52); y
- (d) un marco 4 (FW4) que tiene la secuencia de FGQGTKVEIKRTV (SEQ ID NO: 59)

3. El anticuerpo o la parte funcional del mismo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o la parte funcional del mismo comprenden:

(i) una secuencia de dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia

**EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNN
PYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGP
45 GTLTVTVSS (SEQ ID NO:7),**

y/o
(ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia que tiene al menos el 70 % de identidad de secuencia con la secuencia
50 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQHYXRFPTYTFGQGTKLEIKRTV, en la que X es I o M (SEQ ID NO:8).

4. El anticuerpo o la parte funcional del mismo de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo o la parte funcional del mismo comprenden un dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia de

**EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNN
PYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGP
55 GTLTVTVSS (SEQ ID NO:7);**

y/o

en donde el anticuerpo o la parte funcional del mismo comprenden un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia de DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ PDDFATYYCQHXYRFPYTFGQGTKVEIKRTV, en la que X es I o M (SEQ ID NO: 11).

5. Un anticuerpo aislado o una parte funcional del mismo de la reivindicación 1 en donde dichos anticuerpo o parte funcional del mismo son opcionalmente humanos, y en donde la especie de *Staphylococcus* es opcionalmente una *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) o una *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM), o una *S. aureus* sensible al compuesto intermedio de la vancomicina (SAIV), y en donde el anticuerpo o la parte funcional del mismo comprenden:

(i)

(a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNN
PYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGP
GTLVTVSS (SEQ ID NO:7)

y

(b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ PDDFATYYCQHXYRFPYTFGQGTKVEIKRTV, en la que X es I o M (SEQ ID NO:11); o

(ii)

(a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNN
PYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGP
GTLVTVSS (SEQ ID NO:9)

y

(b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ PDDFATYYCQHXYRFPYTFGQGTKLEIKRTV, en la que X es I o M (SEQ ID NO:8); o

(iii)

(a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNN
PYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGP
GTLVTVSS (SEQ ID NO:9)

y

(b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQ PDDFATYYCQHXYRFPYTFGQGTKLEIKRA, en la que X es I o M (SEQ ID NO:10); o

(iv)

(a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNN
 PYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGP
 GTLVTVSS (SEQ ID NO:9)

5 y
 (b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de
 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLT
 ISSLQPDDFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKVEIKRTV, en la que X es I o M (SEQ ID NO:11); o

(v)

10 (a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNN
 PYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGP
 GTLVTVSS (SEQ ID NO:7)

15 y
 (b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de
 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGVPSRFSGSGSGTEFTLT
 ISSLQPDDFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKLEIKRTV, en la que X es I o M (SEQ ID NO:8); o

(vi)

20 (a) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSRFAMSWVRQAPGRGLEWVASINNGNN
 PYYARSVQYRFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAKDHPSSGWPTFDSWGP
 GTLVTVSS (SEQ ID NO:7)

25 y
 (b) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de
 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITCRASENVGDWLAWYRQKPGKAPNLLIYKTSILESGV
 PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQHYXRFPTYFGQGTKLEIKRA, en la que X es I o M (SEQ ID
 NO:10).

30 6. Un anticuerpo aislado o una parte funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprenden:

- (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 55 (Fig 9A, cadena pesada de rF1) y
- (b) una cadena ligera que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 57 (Fig 9B, cadena ligera de rF1).

35 7. Un anticuerpo aislado o una parte funcional del mismo que pueden unirse a una especie de *Staphylococcus*, que comprende:

- (a) una secuencia de CDR1 de cadena pesada RFAMS (SEQ ID NO:1), y
- (b) una secuencia de CDR2 de cadena pesada SINNGNNPYYARSVQY (SEQ ID NO:2), y
- (c) una secuencia de CDR3 de cadena pesada DHPSSGWPTFDS (SEQ ID NO:3), y
- (d) una secuencia de CDR1 de cadena ligera RASENVGDWLA (SEQ ID NO:4), y
- (e) una secuencia de CDR2 de cadena ligera KTSILES (SEQ ID NO:5), y
- (f) una secuencia de CDR3 de cadena ligera QHYXRFPTY (SEQ ID NO:6), en la que X es I o M

45 con la(s) sustitución(es) de aminoácidos de cualquiera de las siguientes (i), (ii) y (iii):

- (i) una asparagina en la posición 53 en el dominio variable de cadena pesada ha sido reemplazada por otro aminoácido, con lo que la numeración de aminoácidos es de acuerdo con Kabat (1991), en donde el aminoácido es serina; o

50

- (ii) una asparagina en la posición 53 en el dominio variable de cadena pesada se reemplaza con una serina, en donde una alanina en la posición 114 se reemplaza con una cisteína, y en donde una arginina en la posición 222 se reemplaza con una lisina, por lo que la numeración de aminoácidos es de acuerdo con Kabat (1991); o
- (iii) una valina en la posición 205 del dominio variable de cadena ligera se reemplaza con cisteína, una alanina en la posición 110 del dominio variable de cadena ligera se reemplaza con valina y una leucina en la posición 104 del dominio variable de cadena ligera se reemplaza con una valina, por lo que la numeración de aminoácidos es de acuerdo con Kabat (1991).
8. Un anticuerpo aislado o una parte funcional del mismo de acuerdo con la reivindicación 7 que comprenden:
- (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 56 (Fig 9A, rF1 A114C) y
- (b) una cadena ligera que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 58 (Fig. 9B, rF1 V205G).
9. Una composición que comprende una parte funcional del anticuerpo de la reivindicación 1, en la que la parte funcional de un anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo monocatenario, un nanocuerpo, un unicuerpo, un fragmento variable monocatenario (scFv), un fragmento Fab y un fragmento F(ab')₂.
10. Una secuencia de ácido nucleico aislada, sintética o recombinante que codifica:
- (i) cualquiera de los anticuerpos o partes funcionales de los mismos de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8; o
- (ii) CDR1, CDR2 o CDR3 de cadena pesada o CDR1, CDR2 o CDR3 de cadena ligera,
- en donde la secuencia se selecciona de entre el grupo que consiste en una secuencia de CDR1 de cadena pesada cgcttgccatgagc (SEQ ID NO:12), una secuencia de CDR2 de cadena pesada tcgatcaataatgggaataacccatactacgcacggctcggtacaatac (SEQ ID NO:13), una secuencia de CDR3 de cadena pesada gatcacctagtagtggtggccaccttgactcc (SEQ ID NO:14), una secuencia de CDR1 de cadena ligera cgggccagtgaaaacgttggtgactggtggcc (SEQ ID NO:15), una secuencia de CDR2 de cadena ligera aagacatctattctagaaagt (SEQ ID NO:16) y una secuencia de CDR3 de cadena ligera caacactatatacgtttcccgtacact (SEQ ID NO:17).
11. Una célula aislada que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 10.
12. Un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso como medicamento y/o agente profiláctico.
13. Un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso:
- (i) como medicamento y/o agente profiláctico para tratar y/o evitar un trastorno relacionado con una bacteria gram positiva; o
- (ii) en el diagnóstico *in vivo* de una infección por *Staphylococcus*.
14. El uso de un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10 para la preparación de un medicamento y/o un agente profiláctico para tratar y/o evitar un trastorno relacionado con una bacteria gram positiva.
15. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10, y un vehículo, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
16. Una célula productora de anticuerpos aislados o recombinantes que puede producir un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
17. Un método para producir un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende proporcionar una célula con una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10 y permitir que dicha célula traduzca dicha secuencia de ácido nucleico, produciendo de ese modo dichos anticuerpo o parte funcional del mismo, comprendiendo además el método opcionalmente recoger, purificar y/o aislar dichos anticuerpo o parte funcional del mismo.
18. Uso *in vitro* de un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 10:
- (i) para el diagnóstico de una infección por *Staphylococcus*, o

(ii) para detectar *S. aureus* y/o *S. epidermidis*.

19. Un método para aislar bacterias *S. aureus* y/o *S. epidermidis* a partir de una solución que usa un anticuerpo o una parte funcional del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

5

Figura 1

Clon aMRSA F1

NB: numeración CDR de acuerdo con Kabat y col., (1991)

Cadena pesada

Recombinada a partir de segmentos génicos:

IGHV3-23*01

IGHD6-19*01

IGHJ4*02

AMINOÁCIDO:

Fw1 EVQLLES^{GGGLVQPGGSLRLS}CAASGFTLS

CDR1 RFAMS

Fw2 WVRQAPGRGLEWVA

CDR2 SINNGNNPYYAR^{SVQY}

Fw3 RFTVSRDVSQNTVSLQMNNLRAEDSATYFCAK

CDR3 DHPSSGWPTFDS

Fw4 WPGGTLVTVSS

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gag gtg caa ctg ttg gag tcg ggg ggg ggc ttg gtg cag ccg ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc
tgt gca gcc tet gga ttc acc ctt agc

CDR1 cgc ttt gcc atg agc

Fw2 tgg gtc cgc cag get cca gga agg gga ctg gaa tgg gtc gca

CDR2 tcg atc aat aat ggg aat aac cca tac tac gca cgg tcg gta caa tac

ES 2 673 323 T3

Fw3 cgc ttc acc gtc tcc cgg gac gtc tcc cag aac act gtg tet ctg cag atg aac aac ctg aga gcc
gaa gac teg gcc aca tat ttc tgt gct aaa

CDR3 gat cac cct agt agt ggc tgg ccc acc ttt gac tcc

Fw4 tgg ggc cgg gga acc ctg gtc acc gtc tcc teg

Cadena ligera

Recombinada a partir de segmentos génicos:

IGKV1-5*03

IGKJ2*01

AMINOÁCIDO:

Fw1 DIQLTQSPSALPASVGDRVSITC

CDR1 RASENVGDWLA

Fw2 WYRQKPGKAPNLLIY

CDR2 KTSILES

Fw3 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC

CDR3 QHYIRFPYT

Fw4 FGQG'GTKLEIKRTV

NUCLEÓTIDO:

Fw1 gac atc cag ttg acc cag tet cct tcc gcc ctg cct gea tet gtg gga gac aga gtc agc atc act
tgt

CDR1 cgg gcc agt gaa aac gtt ggt gac tgg ttg gcc

Fw2 tgg tat cgg cag aaa cgg ggg aaa gcc cct aat ctt etc atc tat

CDR2 aag aca tet att cta gaa agt

ES 2 673 323 T3

Fw3 ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc agt ggg tct ggg aca gaa ttc act etc acc atc agc agc
ctg cag cct gat gat ttt gca act tat tac tgt

CDR3 caa cac tat ata cgt ttc ccg tac act

Fw4 ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cga act gtg

Figura 2A

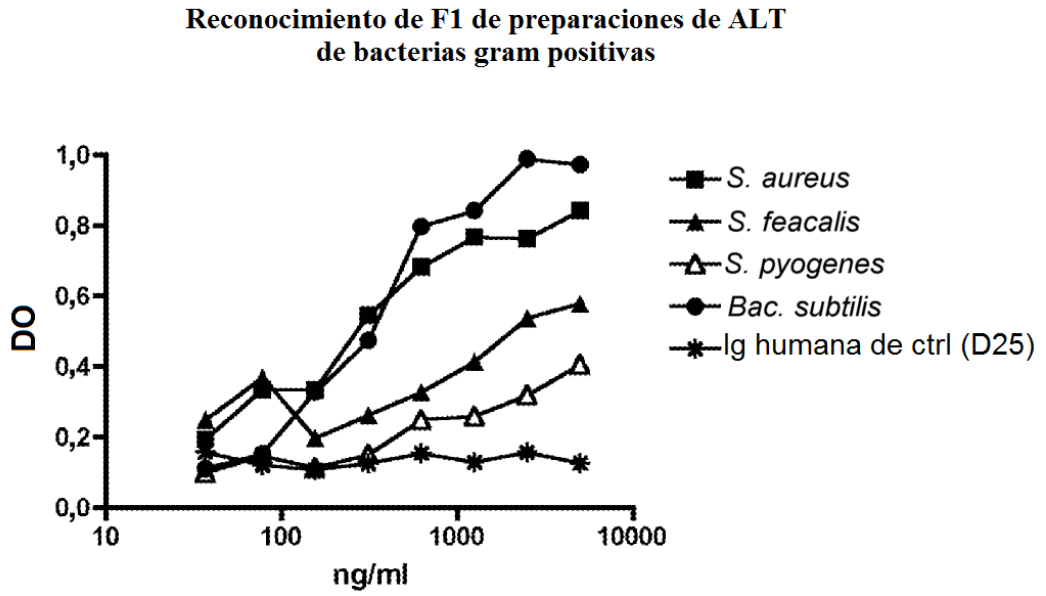


Figura 2B

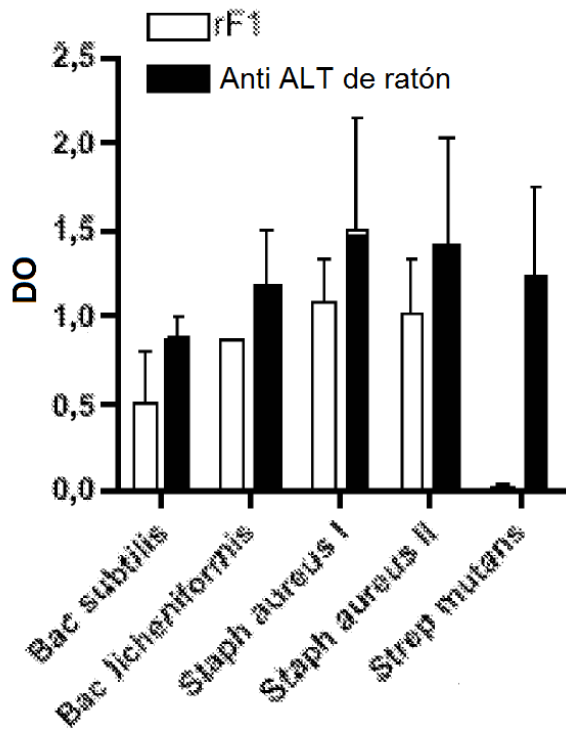


Figura 3A

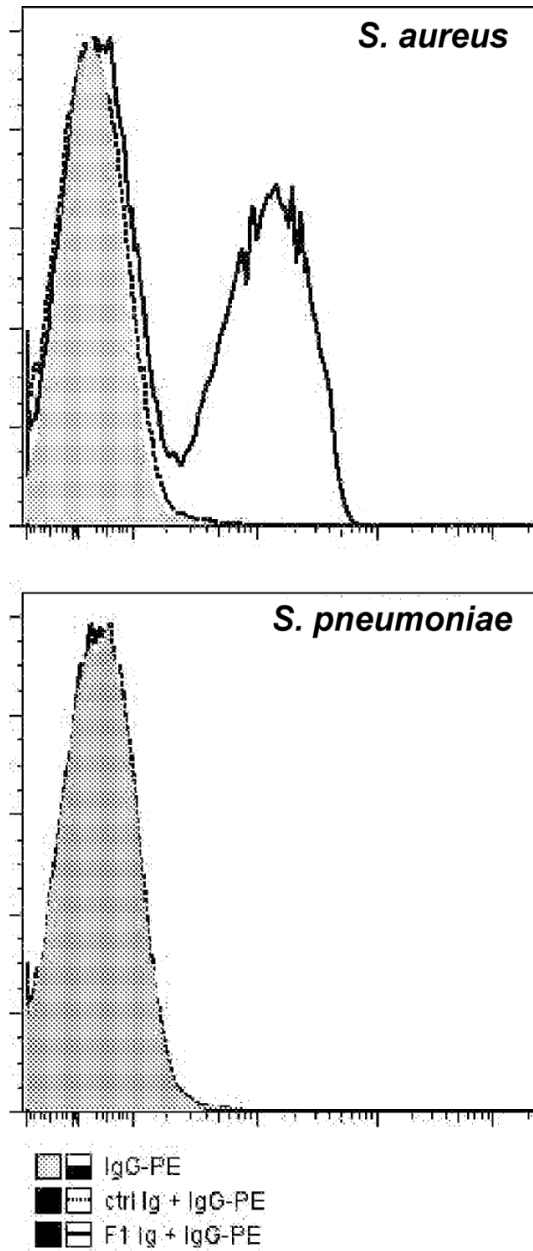
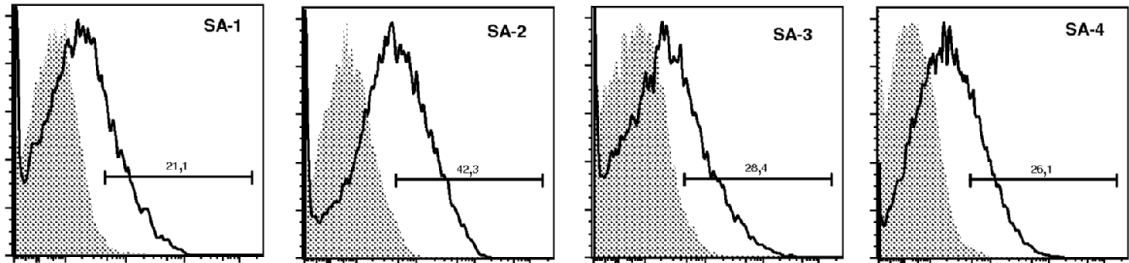


Figura 3B



cepas clínicas de TB por SA del 02 de julio de 2009

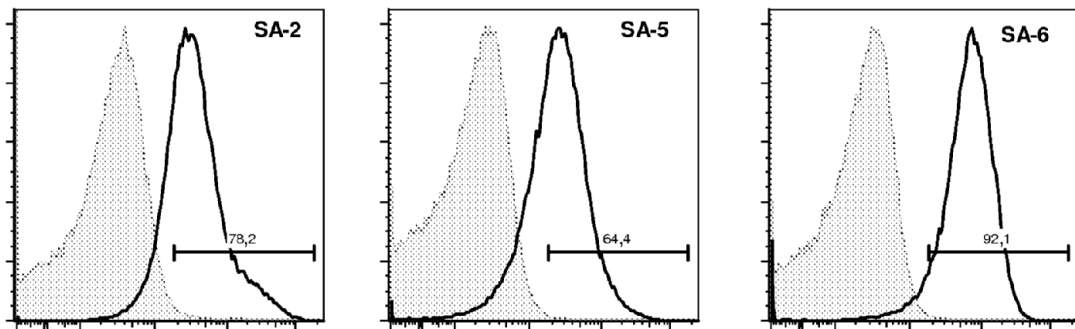


Figura 4A

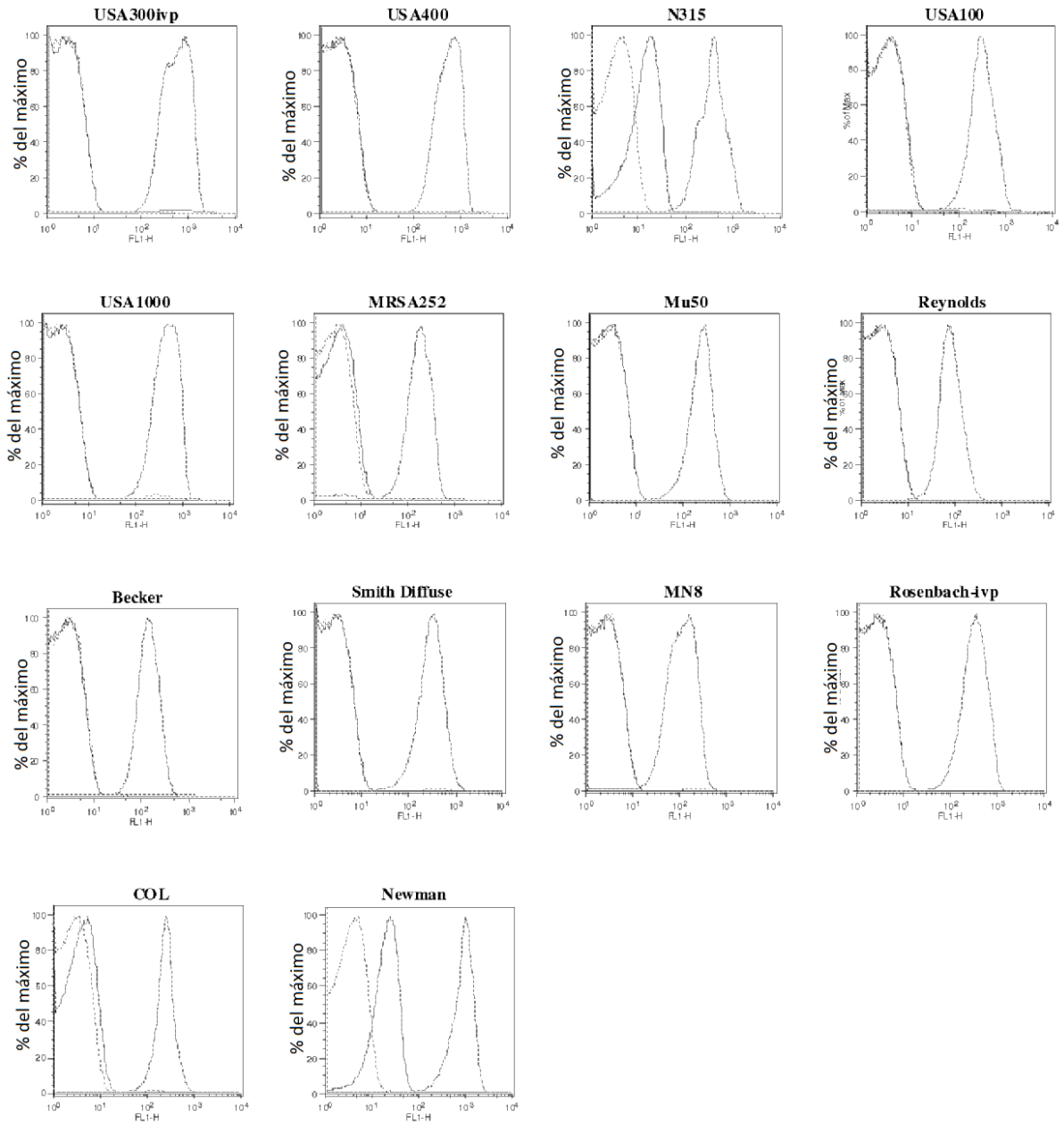


Figura 4B

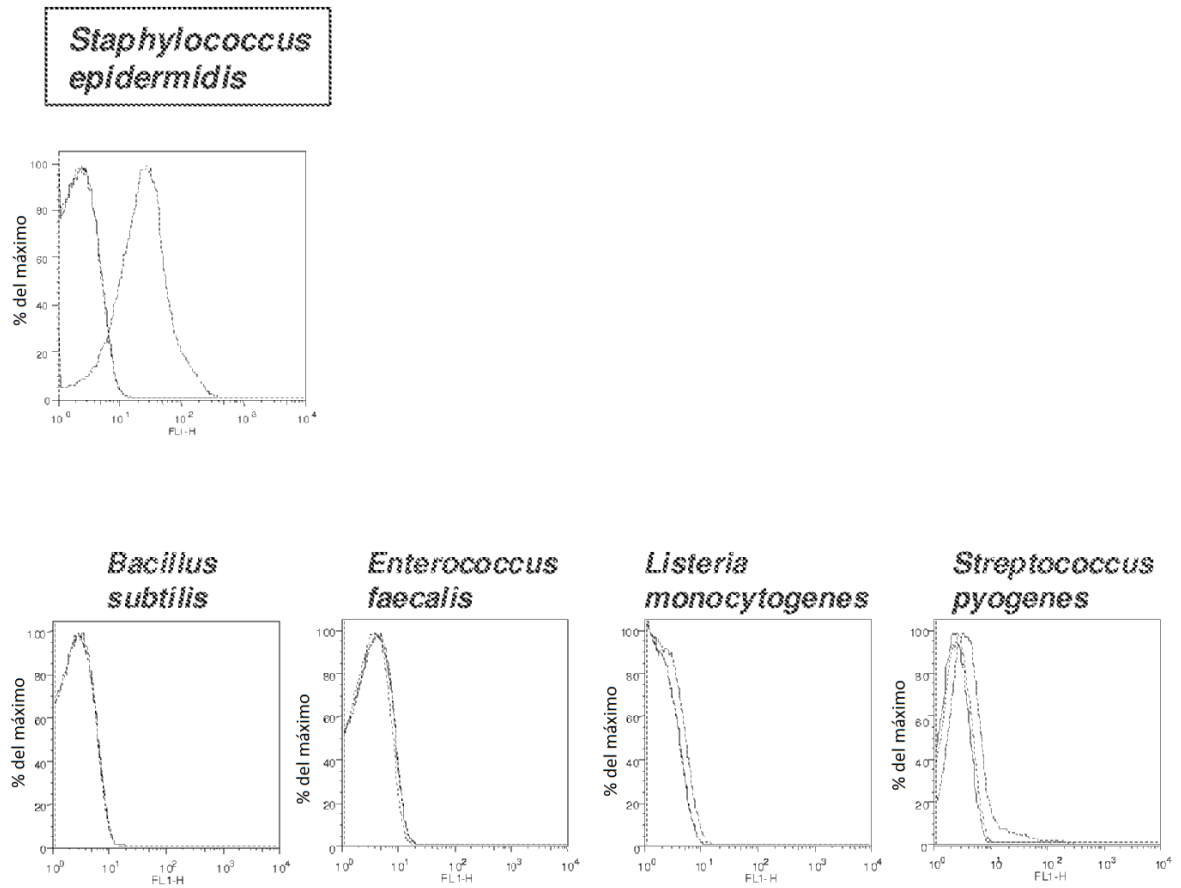
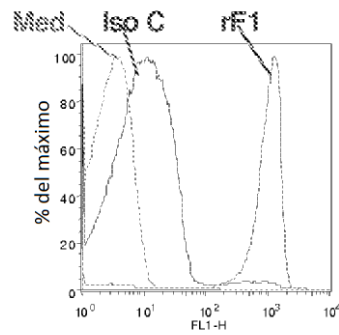


Figura 5

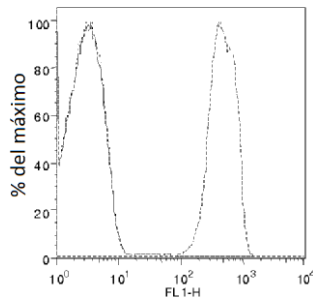
A

SARM IN VITRO

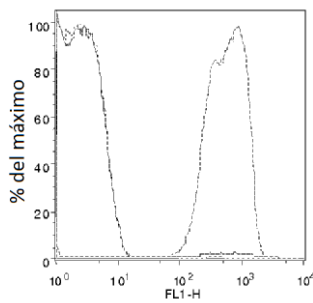
log temprano
(2 h)



Posterior
exponencial
(8 h)



Colonias
sólidas
(agar)

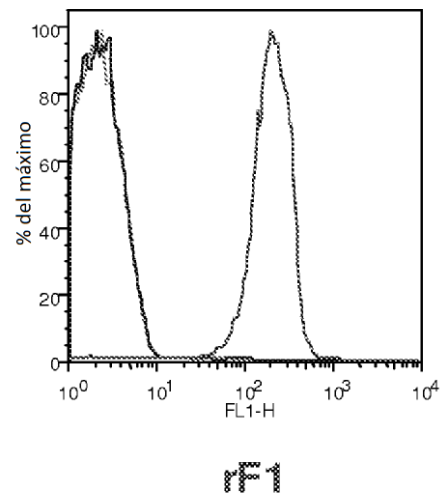


rF1

B

SARM IN VIVO

Infección sistémica en ratones;
homogeneizar riñones;
análisis FACS



rF1

Figura 6A

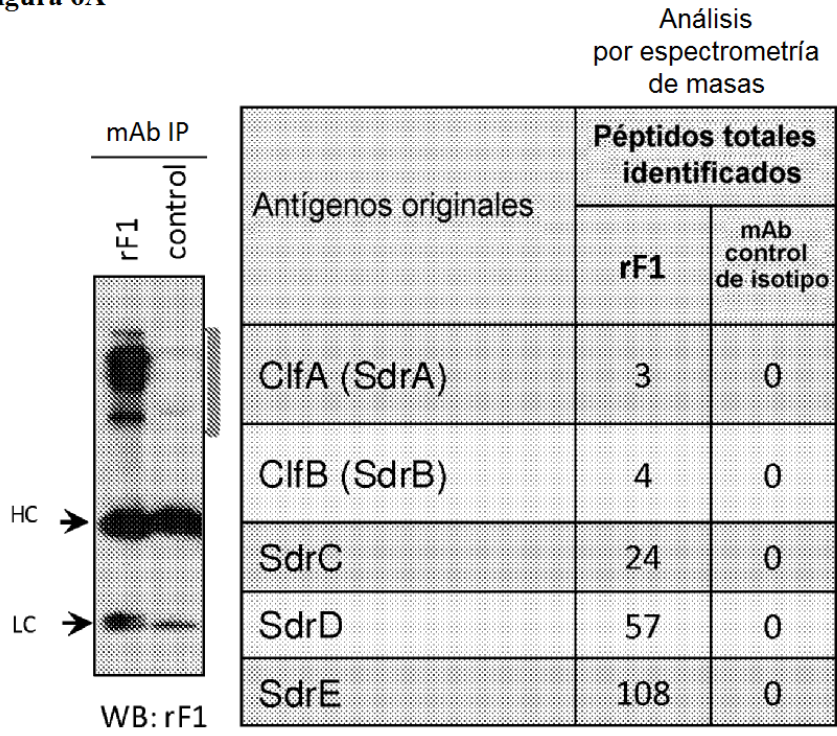


Figura 6B

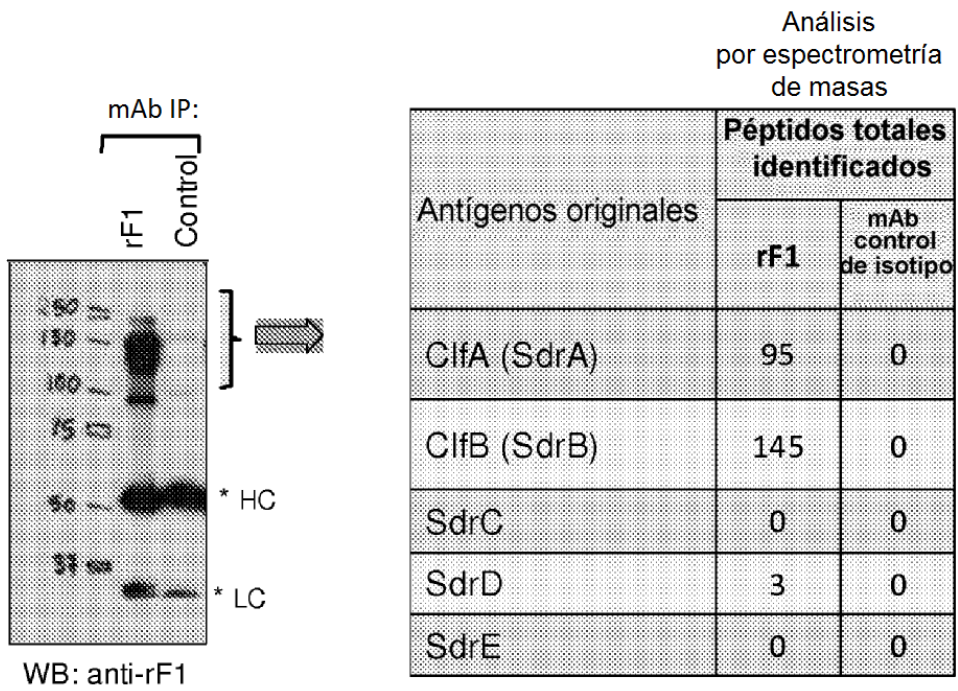
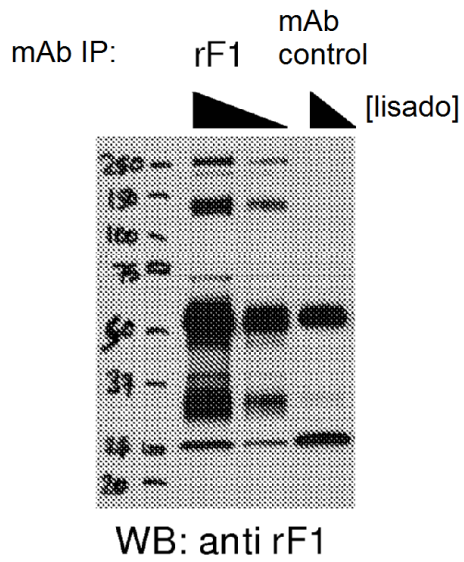


Figura 6C



Análisis por espectrometría de masas: Péptidos originales/totales

	rF1		ITC52 ⁺	
	U	T	U	T
SdrF	27	100		0
SdrG	8	25		0
SdrH	3	4		0

Figura 7A

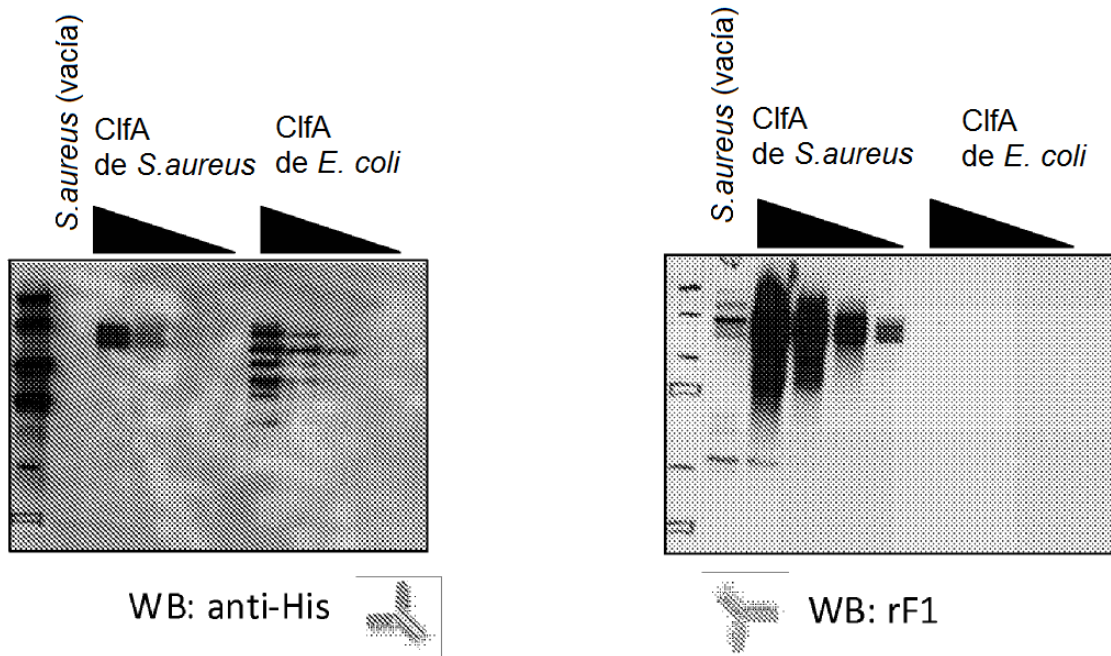


Figura 7B

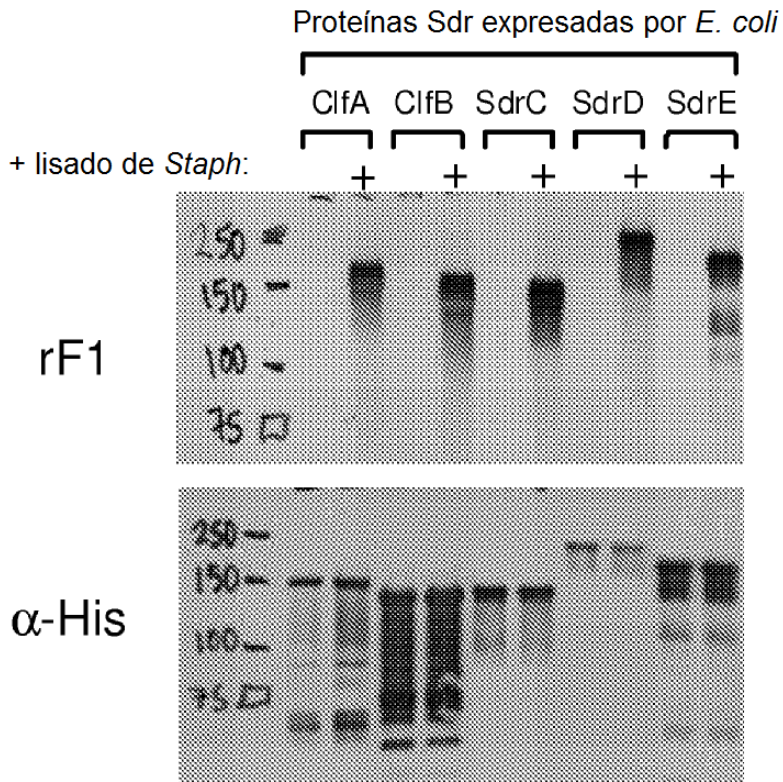


Figura 8

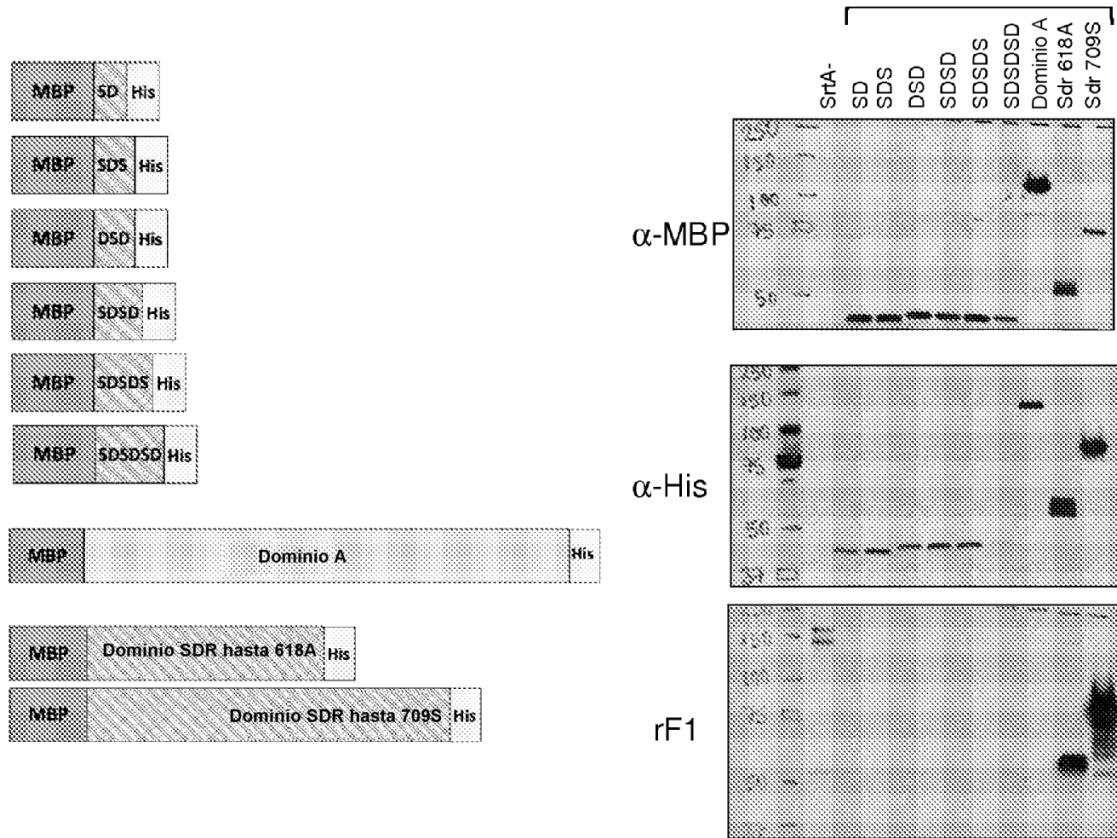


Figura 9A

Cadena pesada F1A114C de rF1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	A	S	G	F	T	L	S	R	F	A	M
	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	A	S	G	F	T	L	S	R	F	A	M
Cadena pesada F1A114C de rF1	35	A	B	W	V	R	Q	A	P	G	R	G	L	E	W	V	A	S	I	N	A	B	C	N	G	N	N	P	Y	A	R	S	V		
	S	.	.	W	V	R	Q	A	P	G	R	G	L	E	W	V	A	S	I	N	A	B	C	N	G	N	N	P	Y	A	R	S	V		
	S	.	.	W	V	R	Q	A	P	G	R	G	L	E	W	V	A	S	I	N	A	B	C	N	G	N	N	P	Y	A	R	S	V		
Cadena pesada F1A114C de rF1	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	
	Q	Y	R	F	T	V	S	R	D	V	S	Q	N	T	V	S	L	Q	M	N	N	L	R	A	E	D	S	A	T	Y	F	C	A	K	
	Q	Y	R	F	T	V	S	R	D	V	S	Q	N	T	V	S	L	Q	M	N	N	L	R	A	E	D	S	A	T	Y	F	C	A	K	
	Q	Y	R	F	T	V	S	R	D	V	S	Q	N	T	V	S	L	Q	M	N	N	L	R	A	E	D	S	A	T	Y	F	C	A	K	
Cadena pesada F1A114C de rF1	95	96	97	98	99	100	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	A	B	C	D	E
	D	H	P	S	S	G	W	P	T	F	D	S	W	G	P	G	T	L	V	T	V	S	S	
	D	H	P	S	S	G	W	P	T	F	D	S	W	G	P	G	T	L	V	T	V	S	S	
	D	H	P	S	S	G	W	P	T	F	D	S	W	G	P	G	T	L	V	T	V	S	S	
Cadena pesada F1A114C de rF1	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	
	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	.	.	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	
	C	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	.	.	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	
	C	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	.	.	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	
Cadena pesada F1A114C de rF1	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	
	F	P	E	P	V	T	V	.	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	.	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	.	
	F	P	E	P	V	T	V	.	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	.	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	.	
	F	P	E	P	V	T	V	.	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	.	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	.	
Cadena pesada F1A114C de rF1	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	
	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	.	Q	.	Q	.	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S
	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	.	Q	.	Q	.	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S
	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	.	Q	.	Q	.	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S
Cadena pesada F1A114C de rF1	216	217	218	219	A	220	221	222	223	A	B	C	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240						
	N	T	K	V	.	D	K	R	V	E	P	K	S	C	.	D	.	.	K	T	H	T	C	P						
	N	T	K	V	.	D	K	R	V	E	P	K	S	C	.	D	.	.	K	T	H	T	C	P						
	N	T	K	V	.	D	K	R	V	E	P	K	S	C	.	D	.	.	K	T	H	T	C	P						

Figura 9B

<p>Cadena ligera rF1 V205C de rF1</p>	<p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32</p> <p>D I Q L T Q S P S A L P A S V G D R V S I T C R A S E . . . N V G D W</p>
<p>Cadena ligera rF1 V205C de rF1</p>	<p>33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70</p> <p>L A W Y R Q K P G K A P N L L I Y K T S I L E S G V P S R F S G S G S G T E</p>
<p>Cadena ligera rF1 V205C de rF1</p>	<p>71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97</p> <p>F T L T I S S L Q P D D F A T Y Y C Q H Y M R F P . . . Y T F G Q G T</p>
<p>Cadena ligera rF1 V205C de rF1</p>	<p>103 104 105 106 107 107a 108 109 A 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 A 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137</p> <p>K L E I K . R . . V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N</p>
<p>Cadena ligera rF1 V205C de rF1</p>	<p>138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175</p> <p>N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L</p>
<p>Cadena ligera rF1 V205C de rF1</p>	<p>176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 A 207 208 209 210 211 212</p> <p>S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T . K S F N R G</p>
<p>Cadena ligera rF1 V205C de rF1</p>	<p>213 214 215 216</p> <p>E C . .</p>