



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 296 694**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/31** (2006.01)

**C07K 14/31** (2006.01)

**C07K 16/12** (2006.01)

**A61K 39/085** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/00** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01122636 .2**

(86) Fecha de presentación : **13.09.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1188831**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **20.03.2002**

(54) Título: **Diana de la proteína de activación de ARNIII (TRAP).**

(30) Prioridad: **10.09.1999 US 393862**  
**15.09.1998 US 100415 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.05.2008**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.05.2008**

(73) Titular/es: **Naomi Balaban**  
**36 Walcott Valley Drive**  
**Hopkinton, Massachusetts 01748, US**

(72) Inventor/es: **Balaban, Naomi y**  
**Goldkorn, Tzipora**

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Diana de la proteína de activación de ARNIII (TRAP).

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere, en general, al campo de las proteínas y de los procedimientos para su uso, y más específicamente, a las proteínas y a las porciones de las mismas que regulan la ruta mediante la que *Staphylococcus aureus* forma toxinas.

10 **Antecedentes de la invención**

La bacteria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) patógena aeróbica gram-positiva habita en la piel y en la membrana mucosa de los seres humanos y de otros animales. *S. aureus* provoca enfermedades que varían de infecciones cutáneas menores a infecciones que suponen un peligro para la vida tales como neumonía, endocarditis, meningitis, infecciones postoperatorias de heridas, septicemia y síndrome del choque tóxico. El staphylococcus es una de las causas más comunes de las infecciones adquiridas en hospitales de todo el mundo, y los informes acerca de los niveles en aumento de la resistencia a antibióticos de último recurso tales como la vancomicina plantean un grave problema a la sanidad pública internacional.

El *S. aureus* patógeno provoca la enfermedad principalmente mediante la producción de factores de virulencia tales como hemolisinas, enterotoxinas y la toxina del síndrome del choque tóxico. Las toxinas pueden interferir en el sistema inmunológico del huésped y degradar componentes tisulares tales como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos. En cultivo, estas toxinas son únicamente producidas a densidades celulares más elevadas (p. ej., en la fase de crecimiento post-exponencial). A menores densidades durante la fase exponencial temprana, las bacterias expresan moléculas superficiales tales como las proteínas de unión a la fibronectina, las proteínas de unión al fibrinógeno y la proteína A, lo que facilita la adherencia de las bacterias a las células huésped y burlan las defensas inmunológicas del huésped. Este fenómeno de variación de la fase de crecimiento permite que las bacterias se adhieran a las células huésped cuando están en números bajos, pero también permite que se “separen” y se propaguen cuando hay un número elevado, permitiendo así la diseminación y la propagación de la infección (Lowy *New Eng. J. Med.* 339: 520-32 (1998)).

La regulación asociada a la fase de crecimiento de la síntesis de los factores de virulencia de *S. aureus* está controlada por un mecanismo de autoinducción. El control de la producción de los factores de virulencia es un proceso complejo, que aparentemente supone la participación de múltiples locus reguladores globales. Uno de estos locus reguladores, el locus *agr*, contiene dos unidades de transcripción divergentes, ARNII y ARNIII, estando ambas activas únicamente a partir de la fase exponencial media del crecimiento y siendo autocatalíticas (Novick *et al. Mol. Gen. Genet.* 248: 446058 (1995)). ARNIII, una molécula reguladora del ARN codificada por el locus *agr*, regula secuencia arriba los genes codificantes de la exomoléculas tóxicas, mientras que secuencia abajo regula los genes codificantes de las moléculas superficiales, dando como resultado *in vivo* la diseminación y la enfermedad (Novick *et al. EMBO J.* 12:3967-75 (1993); Balaban *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92: 1619-23 (1995); Moerfeldt *et al. EMBO J.* 14:4569-77 (1995)). El locus ARNII regula la expresión del ARNIII. El locus ARNII comprende cuatro marcos de lectura abiertos (ORF), *agrA*, *agrB*, *agrC* y *agrD*. Los genes *agrA* y *agrC* codifican una ruta clásica de transducción de señales de dos componentes, codificando *agrC* un receptor de señales y *agrA*, el regulador de respuestas.

Los autoinductores de ARNIII que han sido descritos hasta la fecha incluyen la proteína activadora de ARNIII independiente de *agr* (RAP, *RNAIII Activating Protein*) (Balaban *et al.* (1995) *supra*; Balaban *et al. Science* 280: 438-40 (1998)) y la feromona octapeptídica derivada de *agrD* (Ji *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 12055-9 (1995)), que se une a y activa la fosforilación de AgrC (Lina *et al. Mol. Microbiol.* 28:655-662 (1998), que se cree, a su vez, que fosforila AgrA, conduciendo a la regulación secuencia arriba de ARNIII (Moerfeldt *et al., FEMS Microbiol. Lett.* 143: 195-201 (1996)). También se ha observado que el octapéptido derivado de *agrD* forma parte de un sistema de “interferencias bacterianas” que proporciona un mecanismo para que diferentes cepas de *S. aureus* compitan entre sí en una zona de infección (Ji *et al. Science* 276: 2027-30 (1997)). En este sistema de interferencias bacterianas, el octapéptido activa la transcripción de ARNIII de la cepa mediante la que es producido, mientras que actúa además como un inhibidor de la transcripción de ARNIII de otras cepas de staphylococcus.

Además de *agr*, el locus *sar* también desempeña un papel en la regulación de la producción de los factores de virulencia de *S. aureus*. El locus *sar* comprende un ORF de *sarA* precedido por una región promotora triple intercalada con dos ORF más pequeños putativos (ORF3 y ORF4). El sistema promotor triple produce tres transcritos *sar* solapantes (*sarA*, *sarC* y *sarB*) (Bayer *et al. J. Bacteriol.* 178:4563-70 (1996)). Se ha observado que la proteína *SarA* se une a la región promotora *agr* y estimula la transcripción de ARNII (Chien *et al. J. Biol. Chem.* 273:2645-52 (1998)).

*S. aureus in vivo* produce primero proteínas que facilitan la unión bacteriana a células huésped, así como las moléculas autoinductoras secretadas. A medida que la colonia bacteriana va aumentando en densidad, las moléculas autoinductoras se van acumulando. Tras alcanzar una concentración umbral, los autoinductores activan la transcripción de ARNIII, que a su vez da como resultado la producción de los factores de virulencia. Los factores de virulencia dañan y finalmente destruyen las células huésped de alrededor, que sirven como recursos nutritivos para las bacterias de *S. aureus*, promoviendo un mayor crecimiento de la colonia. De este modo, la inhibición del ARNIII mediante la supresión de los autoinductores o de sus receptores es de un interés particular en el tratamiento o la prevención de la

enfermedad mediada por *S. aureus*. Se han identificado varios mecanismos para la inhibición del ARNIII, incluyendo la inhibición del ARNIII por anticuerpos anti-RAP y por un péptido denominado péptido inhibidor del ARNIII (RIP, *RNAIII Inhibiting Peptide*), que compite con la RAP (Balaban *et al.* (1995) *supra*). Se ha observado que los animales vacunados con RAP o tratados con RIP están protegidos de la infección por *S. aureus* (Balaban *et al.* (1998), *supra*).

La identificación de más componentes del sistema de regulación de los factores de virulencia de *S. aureus* es de enorme interés, pues proporcionará más dianas terapéuticas. La presente invención proporciona un componente identificado recientemente del sistema que regula la producción de los factores de virulencia de *S. aureus*.

## Referencias

Roychoudhury, S. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, **90**: 965-969 (1993) describieron la identificación de compuestos químicos sintéticos que bloquean la expresión del alginato, un factor de virulencia para el patógeno de la fibrosis quística *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, se ha observado que las moléculas pequeñas tendrían cualquier efecto sobre *S. aureus* u ofrecerían una posible utilidad clínica.

Balaban *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* **92**: 1619-23 (1995) informa sobre la regulación autocrina de la síntesis de toxinas por RIP y RAP.

Ji *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1995) describe un octapéptido que actúa como un autoinductor dependiente de *agr* de ARNIII.

La publicación vía PCT n°: WO 96/106579 por Novick *et al* describe péptidos que tienen un peso molecular de menos de 3 kDa capaces de inhibir la transcripción de ARNIII de *agr* en *S. aureus*. Además, la publicación vía PCT n°: WO 97/44349 por Novick *et al* describe péptidos cíclicos de entre seis y doce aminoácidos, que incluyen cisteína desde la posición 28 de la región *agrD* como capaces, *in vitro*, de inhibir la transcripción de ARNIII de *agr* en *S. aureus*.

Ji *et al. Science* **276**: 2027-30 (1997) describe el fenómeno de la interferencia bacteriana mediada por octapéptidos.

Balaban *et al. Science* **280**: 438-440 (1998) describe la inhibición de la infección por *S. aureus* en ratones usando RIP, péptidos sintéticos y anticuerpos anti-RAP.

Novick *et al. Curr. Opin. Microbiol.* **2**:40-5 (1999) revisa la regulación de los genes de virulencia en staphylococcus y otras bacterias gram-positivas.

Mayville *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* **96**: 1218-23 (1999) informa que el octapéptido contiene un resto de tiolactona.

Los datos secuenciales del genoma de *S. aureus* y el cóntigo 876 fueron obtenidos de la página Web del Proyecto de Secuenciación del Genoma de *Staphylococcus aureus* en [http://www.genome.ou.edu/staph\\_blast.html](http://www.genome.ou.edu/staph_blast.html).

## Resumen de la invención

La presente invención se dirige a una proteína aislada de *S. aureus* que es la diana de RAP, denominada TRAP, que se caracteriza por un peso molecular de aproximadamente 21 kDa, por ser capaz de ser fosforilada por RAP, y por comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2. Además, la presente invención se dirige a un anticuerpo inmunorreactivo con TRAP que es preferiblemente un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo humanizado, pero que puede ser un anticuerpo policlonal. La invención proporciona un procedimiento para tratar la infección por *S. aureus* mediante la administración de tal agente de inhibición de TRAP. La invención también ofrece procedimientos para la identificación de compuestos que inhiben la actividad de TRAP y/o inhiben la interacción de TRAP-RAP.

En un aspecto, la invención ofrece un polipéptido TRAP aislado. En realizaciones específicas, el polipéptido TRAP comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2.

Un aspecto de la invención es una formulación farmacéutica para usar en la inhibición o la supresión de la producción de toxinas por bacterias de staphylococcus, particularmente, de *S. aureus*.

Otro aspecto de la invención es una formulación que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente inhibidor de TRAP, p. ej., anticuerpo anti-TRAP.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para tratar una infección por staphylococcus mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un agente inhibidor de TRAP.

Otro aspecto más de la invención es un procedimiento para identificar agentes que inhiben la producción de los factores de virulencia de staphylococcus rastreando los agentes en cuanto a su actividad en la inhibición de la interacción de TRAP-RAP y/o la inhibición de la actividad de TRAP fosforilada.

Una característica de la invención es que la identificación y el aislamiento de TRAP proporciona una nueva diana para ser usada en el rastreo de compuestos destinados a la prevención y/o al tratamiento de la infección por *S. aureus*.

Otra característica de la invención es que los agentes inhibidores de TRAP, bien solos o en diferentes combinaciones con otros compuestos eficaces en la inhibición de la producción de los factores de virulencia de *S. aureus*, pueden ser usados para tratar eficazmente las infecciones por staphylococcus.

Éstos y otros objetivos, ventajas, características y aspectos de la presente invención resultarán evidentes para aquellos expertos en la técnica tras la lectura de la revelación.

### Breve descripción de las figuras

La fig. 1 es un diagrama simplificado que resume el papel de RAP, TRAP y ARNIII en la producción de toxinas en staphylococcus.

La fig. 2 es un diagrama simplificado que resume el papel de RIP y la inhibición de la producción de los factores de virulencia en staphylococcus no patógenos.

La fig. 3 es un autorradiograma de células de *S. aureus* incubadas en tampón libre de fosfato (PFB) con <sup>32</sup>P con RAP en PBS (columna de la izquierda) y con PBS solo (columna de la derecha) como control, mostrando que la TRAP es una proteína de aproximadamente 21 kDa fosforilada específicamente por RAP. Las células incubadas fueron recogidas, aplicadas a SDS PAGE y autorradiografiadas sobre gel para obtener el autorradiograma.

La fig. 4 es un gráfico de barras obtenido mediante el rastreo de la densidad de las bandas de la fig. 3.

La fig. 5 es un autorradiograma de células de *S. aureus* cultivadas desde la fase lag hasta la fase log tardía del crecimiento en PBF con <sup>32</sup>P. Las células fueron recogidas, aplicadas a SDS PAGE y autorradiografiadas sobre gel.

La fig. 6 es un gráfico de barras obtenido mediante el rastreo de las bandas de la fig. 5 para determinar su densidad.

La fig. 7 es un gráfico de las cantidades de TRAP, ARNIII y el número de células frente al tiempo en horas.

La fig. 8 es un autorradiograma que muestra la fosforilación de TRAP en células de *S. aureus* sin *agr* mutantes.

La fig. 9 es un autorradiograma que muestra la inhibición de la fosforilación de TRAP por un octapéptido de *agrD*. Pista 1: flujo a través de sobrenadantes post-exponenciales de *S. aureus* de tipo salvaje que contienen el octapéptido codificado por *agrD* (<3); pista 2: sobrenadantes post-exponenciales de *S. aureus* de tipo salvaje (total); pista 3: RAP; pista 4: PBS.

La fig. 10 es un gráfico de barras que muestra la densidad de las bandas del autorradiograma de la fig. 9.

La fig. 11 es un gráfico de barras que muestra la activación de ARNIII por el octapéptido (<3); sobrenadante total (total), RAP y PBS.

La fig. 12 es un autorradiograma que muestra que la fosforilación de TRAP es activada en presencia de RAP e inhibida en presencia de RIP.

La fig. 13 es un gráfico de barras de la densidad de las bandas del autorradiograma de la fig. 12.

La fig. 14 es un gráfico de barras que muestra el efecto de RIP, de RAP y de la combinación de RIP y RAP sobre la fosforilación de TRAP.

La fig. 15 es un gráfico de barras que muestra el efecto de RIP, de RAP y de la combinación de RIP y de RAP sobre la transcripción de ARNIII.

La fig. 16 es un diagrama que resume las rutas de transducción de señales que participan en la producción de los factores de virulencia de staphylococcus.

La fig. 17 es un diagrama de barras que muestra que la fosforilación de TRAP es estable en condiciones básicas pero no ácidas.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

A no ser se que defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que es comúnmente entendido por cualquier experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque es posible usar cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en la

presente memoria en la práctica o en la prueba de la presente invención, ahora se describen los procedimientos y los materiales preferidos.

Las publicaciones y las patentes tratadas en la presente memoria son proporcionadas exclusivamente para su revelación con anterioridad a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo que aparece en la presente memoria debe ser interpretado como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder tal publicación o patente en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación o concesión proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas reales, pudiendo ser necesaria su confirmación independiente.

## Definiciones

“TRAP” se refiere a una diana proteica de RAP y es un polipéptido de aproximadamente 21 kDa obtenido de una bacteria staphylococcus, preferiblemente, de *Staphylococcus aureus*, y que es fosforilado por RAP, i.e., proteína activadora de ARNIII. En una realización específica, TRAP comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2. A no ser que se indique específicamente lo contrario, “TRAP” como se usa en la presente memoria pretende englobar proteína TRAP natural, proteína TRAP recombinante, proteína TRAP de longitud completa y fragmentos biológicamente activos de la misma (p.ej., una proteína de TRAP que puede ser fosforilada por RAP (p.ej., para usarla en análisis de rastreo)).

“RAP” o “proteína activadora de ARNIII” se refiere a una proteína de aproximadamente 38 kDa obtenida de una bacteria staphylococcus, preferiblemente, de *Staphylococcus aureus*, que media la fosforilación de la TRAP. A no ser que se indique específicamente lo contrario, “RAP” como se usa en la presente memoria pretende englobar la proteína RAP natural, proteína RAP recombinante, proteína RAP de longitud completa y fragmentos biológicamente activos de la misma (p.ej., un fragmento de RAP que todavía sea activo en la fosforilación de la TRAP (y de ese modo, pueda ser usada en, por ejemplo, análisis de rastreo)).

“Opcional” u “opcionalmente” significa que el hecho o la circunstancia posteriormente descrito puede que ocurra o puede que no ocurra, y que la descripción incluye ejemplos en los que dicho hecho o circunstancia tiene lugar y ejemplos en los que no se produce.

El término “tratamiento” significa cualquier intervención terapéutica realizada en un mamífero, preferiblemente, en un ser humano o un bovino, incluyendo:

- (i) la prevención, es decir, hacer que los síntomas clínicos no se desarrollen, p. ej., evitando que la infección ocurra y/o que desarrolle un estado dañino;
- (ii) la inhibición, es decir, detener el desarrollo de síntomas clínicos, p.ej., detener una infección en curso de manera que la infección sea eliminada por completo o hasta un grado que ya no sea dañino; y/o
- (iii) el alivio, es decir, causar la regresión de los síntomas clínicos, p.ej., bajar la fiebre y/o aliviar la inflamación causada por la infección.

El tratamiento se aplica generalmente a cualquier mamífero susceptible de sufrir una infección por *S. aureus* (p.ej., mamíferos, aves, etc.), generalmente, un mamífero, habitualmente, un ser humano o un bovino en el que se pueda aplicar el tratamiento para la prevención de la infección bacteriana o para la mejoría de la infección bacteriana activa, siendo la bacteria una bacteria staphylococcus, especialmente, *Staphylococcus aureus*.

El término “cantidad eficaz” y/o “cantidad terapéutica” significa una dosificación suficiente para proporcionar tratamiento para el estado patológico que está siendo tratado. Esta variará en función del paciente, de la enfermedad y del tratamiento que se esté realizando. En el caso de una infección bacteriana, una “cantidad eficaz” es esa cantidad necesaria para aumentar sustancialmente la probabilidad de tratar la infección, en particular, la cantidad que aumenta la probabilidad de prevenir la infección con éxito o de eliminar la infección cuando ésta ya se ha producido.

El término “proteína” como se usa en la presente memoria pretende englobar cualquier secuencia de aminoácidos e incluye secuencias modificadas (p.ej., glicosiladas, PEGiladas, que contienen sustituciones de aminoácidos conservativas, etc.). El término incluye proteínas naturales (p.ej., no recombinantes), polipéptidos, péptidos (particularmente, aquéllos aislados de una bacteria staphylococcus, más concretamente, de *Staphylococcus aureus*) y oligopéptidos, así como aquéllas que son sintetizadas recombinante o sintéticamente según procedimientos conocidos en la técnica. Como se usa en relación con la presente invención, el término “proteína” está destinado específicamente a cubrir las proteínas naturales que se producen en *Staphylococcus aureus* y son útiles en el tratamiento de la infección o en la generación de anticuerpos útiles en el tratamiento de la infección. Cuando se cita “polipéptido” o “proteína” en la presente memoria, se refiere a una secuencia de aminoácidos de una molécula proteica natural. “Polipéptido”, “proteína” y términos similares no pretenden limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos nativa completa asociada con la molécula proteica enumerada.

“Polinucleótido” como se usa en la presente memoria, se refiere a un oligonucleótido, nucleótido y fragmentos o porciones de los mismos, así como a ácidos nucleicos peptídicos (ANP), fragmentos, porciones o moléculas antisentido de los mismos, y a ADN o ARN de origen genómico o sintético que pueden ser monocatenarios o bicatenarios,

y representan la cadena sentido o antisentido. Cuando se usa “polinucleótido” para referirse a una secuencia de polinucleótidos específica (p.ej., un polinucleótido codificante de la proteína TRAP), “polinucleótido” pretende englobar los polinucleótidos que codifican una proteína que es funcionalmente equivalente a la proteína enumerada, p.ej., polinucleótidos que son variantes degenerativas (i.e., variantes en la secuencia de ácidos nucleicos que codifican la misma secuencia de aminoácidos y existen debido a la degeneración del código genético) o polinucleótidos que codifican variantes biológicamente activas o fragmentos de la proteína enumerada.

“Polinucleótido antisentido” significa un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de polinucleótidos dada, incluyendo secuencias de polinucleótidos asociadas con la transcripción o la traducción de la secuencia de polinucleótidos dada (p.ej., un promotor) y/o a una secuencia codificante de la secuencia de polinucleótidos dada, siendo el polinucleótido antisentido capaz de hibridarse a una secuencia de polinucleótidos. Son de particular interés los polinucleótidos antisentido capaces de inhibir la transcripción y/o la traducción, bien *in vitro* o *in vivo*.

“Ácido nucleico peptídico” como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula que comprende un oligómero al que se han añadido un residuo de aminoácido, tal como lisina, y un grupo amino. Estas moléculas pequeñas, también denominadas agentes anti-genes, detienen la elongación del transcripto uniéndose a su cadena complementaria (molde) de ácido nucleico (Nielsen *et al*, 1993 *Anticancer Drug Des* 8: 53-63).

El término “anticuerpo” se refiere a una proteína de inmunoglobulina que es capaz de unirse a un antígeno. Anticuerpo como se usa en la presente memoria pretende incluir todo el anticuerpo entero, así como cualquier fragmento de anticuerpo (p.ej., F(ab)’, Fab, Fv) capaz de unirse al epítopo, antígeno o fragmento antigénico de interés. Los anticuerpos preferidos para los análisis y las vacunas de la invención son inmunorreactivos o inmunoespecíficos y, por lo tanto, se unen específica y selectivamente a una proteína de interés, p.ej., a un anticuerpo anti-TRAP. El término “anticuerpo” engloba todos los tipos de anticuerpos, p.ej., policlonales, monoclonales, humanizados, quiméricos y aquéllos producidos mediante la metodología de visualización de fagos. Los anticuerpos particularmente preferidos de la invención son los anticuerpos que tienen un grado relativamente alto de afinidad por TRAP. Un anticuerpo de la invención es preferiblemente inmunorreactivo con e inmunoespecífico para una especie determinada, p.ej., TRAP obtenida de *Staphylococcus aureus*.

Como se usa en la presente memoria, el término “aislado” pretende describir un compuesto de interés (p.ej., bien un polinucleótido o un polipéptido) que está en un ambiente diferente al que el compuesto se da de forma natural. “aislado” pretende incluir compuestos de muestras que están sustancialmente enriquecidas en el compuesto de interés y/o en las que el compuesto de interés está parcial o sustancialmente purificado.

Como se usa en la presente memoria, “sustancialmente purificado” se refiere a un compuesto (p.ej., bien un polinucleótido o un polipéptido) que está retirado de su ambiente natural y está al menos un 60% libre, preferiblemente, un 75% libre, y lo más preferible, un 90% libre del resto de componentes con los que se asocia de forma natural.

El “fragmento antigénico” de una proteína significa una porción de tal proteína que es capaz de unirse a un anticuerpo.

“Unirse específicamente” pretende significar una avidez elevada y/o una unión de alta afinidad de un anticuerpo a un polipéptido específico, p. ej., el epítopo de una proteína, p.ej., la proteína TRAP. La unión del anticuerpo a su epítopo en este polipéptido específico es preferiblemente más fuerte que la unión del mismo anticuerpo a cualquier otro epítopo, particularmente, a aquéllos que pueden estar presentes en moléculas en asociación con, o en la misma muestra, que el polipéptido específico de interés, p.ej., se une más fuertemente a los fragmentos de epítopo de una proteína tal como la TRAP de manera que ajustando las condiciones de unión, el anticuerpo se une casi exclusivamente a un sitio del epítopo o a fragmentos de una proteína deseada.

“Anticuerpo marcado detectablemente” pretende significar un anticuerpo (o un fragmento de anticuerpo que conserva la especificidad de unión) que tiene unida una etiqueta detectable. La etiqueta detectable es normalmente unida mediante conjugación química, pero cuando la etiqueta es un polipéptido, podría ser unida alternativamente mediante técnicas de ingeniería genética. Los procedimientos para la producción de proteínas marcadas detectablemente son conocidos en la técnica. Las etiquetas detectables conocidas en la técnica incluyen radioisótopos, fluoróforos, etiquetas paramagnéticas, enzimas (p.ej., peroxidasa de rábano picante), u otros restos o compuestos que bien emiten una señal detectable (p.ej., radioactividad, fluorescencia, color) o emiten una señal detectable tras la exposición de la etiqueta a su sustrato. En la técnica se conocen diversos pares de etiqueta / sustrato detectables (p.ej., peroxidasa de rábano picante / diaminobencidina, avidina / estreptavidina, luciferasa / luciferina), procedimientos para marcar anticuerpos y procedimientos para usar los anticuerpos marcados (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, eds. (“Antibodies: A Laboratory Manual” (1998), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)). El europio es una etiqueta útil.

## Perspectiva general de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento y el aislamiento de la diana de RAP, denominada TRAP. La TRAP, una proteína de aproximadamente 21 kDa, es fosforilada específicamente por RAP; RIP inhibe la fosforilación

de TRAP. La fosforilación de TRAP conduce a la inducción de ARNIII, que, a su vez, conduce a la expresión de factores de virulencia de *S. aureus*. De este modo, en presencia de RAP, la TRAP es fosforilada, el ARNIII, inducido, y los factores de virulencia, secretados por *S. aureus* (Fig. 1). En presencia de RIP, se inhibe la fosforilación de TRAP por RAP y, así, la producción de los factores de virulencia no se produce a un nivel sustancial o detectable (Fig. 2).

Según el descubrimiento en el que se basa la presente invención, el bloqueo de uno o más sitios de TRAP que son importantes bien en la interacción con RAP, la fosforilación de TRAP por RAP y/o la actividad de TRAP en facilitar la transcripción de ARNIII puede afectar a la ruta mediante la que *S. aureus* forma toxinas. Además, el aumento de la actividad de RIP, que está asociado con la inhibición de TRAP-RAP, también puede servir para perturbar la ruta de producción de los factores de virulencia en *S. aureus*. Por consiguiente, la presente invención también ofrece procedimientos para identificar agentes que inhiben o reprimen la inducción de ARNIII mediante el bloqueo de la actividad de TRAP (p.ej., anticuerpos anti-TRAP), mediante el bloqueo de la fosforilación por RAP de TRAP (p.ej., anticuerpos anti-RAP) y/o mediante el aumento de la inhibición de TRAP mediada por RIP, así como los agentes así identificados. Por lo tanto, la invención también engloba vacunas y terapias farmacológicas para prevenir y/o retardar infecciones en seres humanos y en animales, particularmente, en animales que producen leche, como una alternativa al tratamiento con antibióticos.

Los experimentos descritos en la presente memoria demuestran el aislamiento y la caracterización de TRAP o “la diana de RAP”. La producción de los factores de virulencia de *S. aureus* puede ser bloqueada mediante la inhibición de la actividad de TRAP para facilitar la producción de ARNIII. La actividad de TRAP puede ser inhibida, por ejemplo, 1) inhibiendo la actividad de RAP en la fosforilación de TRAP, 2) aumentando la actividad de RIP en el bloqueo de la fosforilación de RAP y/o 3) inhibiendo la actividad de TRAP fosforilada en la inducción de la producción de ARNIII. La inhibición de la actividad de TRAP puede conseguirse administrando un agente que inhiba la actividad de TRAP a través de uno o más de estos mecanismos. Por consiguiente, la invención engloba procedimientos para identificar tales agentes, así como procedimientos de prevención y/o tratamiento de infecciones por estafilococo mediante la administración de tales agentes. Es posible coadministrar un agente inhibidor de TRAP (p.ej., un anticuerpo anti-TRAP) de o identificado por los procedimientos de la invención con otros agentes cuya actividad en la inhibición de la producción de los factores de virulencia de *S. aureus* haya sido identificada (p.ej., con RIP derivada de un estafilococo no patógeno).

La invención se describe en mayor detalle a continuación.

#### Ácido nucleico y proteínas TRAP

La presente invención proporciona una proteína (TRAP) aislada y purificada procedente de *S. aureus* que es la diana de la proteína activadora de ARNIII. La proteína TRAP tiene un peso molecular de aproximadamente 21 kDa y es fosforilada por proteínas de activación de ARNIII (RAP). La fosforilación de TRAP alcanza un máximo en aproximadamente la fase exponencial media del crecimiento celular y TRAP es esencialmente desfosforilado hacia la fase log tardía del crecimiento celular. En una realización, TRAP es la proteína codificada por un polinucleótido que comprende la secuencia de SEQ ID N°: 1 y comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2. Estas secuencias se proporcionan en el listado secuencial que figura más adelante.

#### Ácido nucleico TRAP

El término “gen TRAP” se usa generalmente para designar los genes y sus formas alternativas de TRAP. “Gen TRAP” también pretende significar el marco de lectura abierto que codifica proteínas TRAP específicas y secuencias adyacentes de nucleótidos no codificantes en 5' y 3' que participan en la regulación de la expresión (p.ej., región promotora). El gen puede ser introducido en un vector apropiado para el mantenimiento extracromosómico o para la integración en el huésped. En una realización, el gen TRAP comprende la secuencia de SEQ ID N°: 1.

Las secuencias reguladoras de TRAP pueden ser usadas para identificar secuencias que actúan en *cis* necesarias para la regulación de la transcripción o de la traducción de la expresión de TRAP, especialmente en diferentes etapas del crecimiento (p.ej., fase log temprana, media y tardía) y para identificar secuencias que actúan en *cis* y factores que actúan en *trans* que regulan o median la expresión de TRAP. Tales regiones de control de la transcripción o la traducción pueden estar unidas operativamente a una secuencia codificante de TRAP o a otra secuencia codificante. En una realización, el gen TRAP es proporcionado como SEQ ID N°: 1. En otra realización, la secuencia codificante de TRAP comprende los residuos de nucleótido 63-565 de la SEQ ID N°: 1, representando los residuos de nucleótido 563-565 un codón de terminación. En una realización, la región no traducida de 5' de TRAP comprende los residuos de nucleótido 1-62 de SEQ ID N°:1. Se puede proporcionar una región promotora de TRAP mediante los residuos de nucleótido 1-40 de SEQ ID N°: 1.

Las composiciones de ácido nucleico usadas en la presente invención pueden codificar toda o una parte de la proteína TRAP según proceda. Se pueden obtener fragmentos de la secuencia de ADN mediante la síntesis química de oligonucleótidos conforme a los procedimientos convencionales, mediante la digestión de enzimas de restricción, mediante la amplificación PCR etc. Para la mayor parte, los fragmentos de ADN serán de al menos aproximadamente diez nucleótidos contiguos, habitualmente, de al menos aproximadamente 15 nt, más habitualmente, de al menos aproximadamente 18 nt a aproximadamente 20 nt, más habitualmente, de al menos aproximadamente 25 nt a aproximadamente

50 nt. Tales fragmentos de ADN pequeños son útiles como cebadores para la PCR, el rastreo por hibridación, etc. Los fragmentos más largos de ADN, i.e., mayores de 100 nt son útiles para la producción del polipéptido codificado. Para su uso en reacciones de amplificación, tales como la PCR, se usará una pareja de cebadores. La composición exacta de las secuencias cebadoras no es fundamental para la invención, pero para la mayoría de las aplicaciones, los cebadores se hibridarán con la secuencia de estudio en condiciones restrictivas según lo conocido en la técnica. Es preferible elegir una pareja de cebadores que genere un producto de amplificación de al menos aproximadamente 50 nt, preferiblemente, de al menos aproximadamente 100 nt. Los algoritmos para la selección de las secuencias cebadoras son generalmente conocidos, y están disponibles en paquetes de programas informáticos comerciales. Los cebadores de amplificación se hibridan con cadenas complementarias de ADN y se cebarán entre sí.

El gen TRAP y la secuencia codificante de TRAP son aislados y obtenidos en forma sustancialmente pura, generalmente, distinta a la del cromosoma bacteriano intacto. Habitualmente, el ADN será obtenido sustancialmente libre de otras secuencias de ácidos nucleicos que no incluyan una secuencia de TRAP o un fragmento de la misma, siendo, generalmente, al menos aproximadamente un 50%, habitualmente, al menos aproximadamente un 90% puro, y comúnmente “recombinante”, i.e., flanqueado por uno o más nucleótidos con los que no está normalmente asociado en un cromosoma natural.

Las secuencias de ADN se usan en una variedad de modos. Pueden ser usadas como sondas para identificar las secuencias codificantes de TRAP de otras cepas de estafilococo o de otras bacterias. Los homólogos aislados de otras cepas, especies o géneros tienen generalmente una similitud secuencial sustancial entre sí, i.e., una identidad secuencial de al menos el 75%, habitualmente, de al menos el 90%, más habitualmente, de al menos el 95%. En general, las secuencias codificantes de TRAP de la invención (incluyendo homólogos, variantes, etc.) se caracterizan por tener una identidad secuencial mayor del al menos aproximadamente 65%, preferiblemente, del al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente, del al menos aproximadamente 85%, pudiendo ser mayor del al menos aproximadamente 90% o más según lo determinado por el logaritmo de búsqueda de homologías de Smith-Waterman como se pone en práctica en el programa MPSRCH (Oxford Molecular). A efectos de la invención, se calcula una identidad secuencial usando el algoritmo de Smith-Waterman como sigue: la identidad global de las secuencias de ADN debe ser mayor del 65% según lo determinado por el logaritmo de búsqueda de homologías de Smith-Waterman como se pone en práctica en el programa MPSRCH (Oxford Molecular) usando una búsqueda de huecos afines con los siguientes parámetros de búsqueda: penalización de apertura de hueco: 12; y penalización de ampliación de hueco: 1.

Los ácidos nucleicos que tienen una similitud secuencial también pueden ser detectados por hibridación en condiciones poco restrictivas, por ejemplo a 50°C y 6 x SSC (solución salina 0,9M / citrato de sodio 0,09M) y permanecer unidos cuando son sometidos a un lavado a 55°C en 1 x SSC (cloruro de sodio 0,15M / citrato de sodio 0,015M). Además, la identidad secuencial también puede ser determinada por hibridación en condiciones muy restrictivas, por ejemplo, a 50°C o más, y en 0,1 x SSC (solución salina 15 mM / citrato de sodio 0,15 mM). Usando sondas, particularmente, sondas marcadas de secuencias de ADN, es posible aislar homólogos o genes relacionados. También puede ser posible identificar homólogos de TRAP de origen mamífero.

El ADN codificante de TRAP también puede ser usado para detectar la expresión del gen en una muestra biológica. Los procedimientos y los materiales para sondear una muestra en cuanto a la presencia de determinadas secuencias de nucleótidos están bien establecidos en la bibliografía y no es necesario entrar en mayor detalle en la presente memoria. Se aísla ARNm de una muestra celular. El ARNm puede ser amplificado por RT-PCR, usando transcriptasa inversa para formar una cadena de ADN complementaria, seguida por la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos para las secuencias de ADN del estudio. Alternativamente, la muestra de ARNm es separada mediante electroforesis sobre gel, se transfiere a un soporte adecuado, p.ej., nitrocelulosa, nailon, etc. y luego se sondea con un fragmento del ADN de estudio como sonda. También pueden ser de uso otras técnicas tales como los análisis de ligación de oligonucleótidos, las hibridaciones *in situ* y la hibridación con sondas de ADN extendidas sobre un chip sólido. La detección de ARNm hibridante con una secuencia de TRAP es indicativo de la expresión de los genes TRAP en la muestra.

La secuencia de ácidos nucleicos de TRAP puede ser modificada para un número de objetos, particularmente, cuando vayan a ser usadas intracelularmente, por ejemplo, siendo unidas a un agente de escisión de ácidos nucleicos, p. ej., un ión metálico quelado, tal como hierro o cromo para la escisión del gen; o similares.

La secuencia codificante de TRAP y/o la secuencia promotora pueden ser mutadas de diversas maneras conocidas en la técnica para generar cambios dirigidos en la fuerza del promotor, la secuencia de la proteína codificada, etc. La secuencia de ADN o el producto de tal mutación será sustancialmente similar a las secuencias proporcionadas en la presente memoria, i.e., diferirán en al menos un nucleótido o aminoácido, respectivamente, y pueden diferir en al menos dos, pero en no más de aproximadamente diez nucleótidos o aminoácidos. Los cambios en las secuencias pueden ser sustituciones, inserciones o deleciones. Las deleciones pueden incluir además cambios mayores, tales como deleciones de un dominio. Otras modificaciones de interés incluyen la producción de proteínas de fusión (p.ej., con proteínas verde fluorescente (GFP), luciferasa y similares).

Las técnicas para la mutagénesis *in vitro* de genes clonados son conocidas. En Gustin *et al.*, 1993 *Biotechniques* 14: 22; Barany, 1985 *Gene* 37: 111-23; Colicelli *et al.*, 1985 *Mol. Gen. Genet.* 199: 537-9; y Prentki *et al.*, 1984 *Gene* 29:303-13, pueden encontrarse ejemplos de los protocolos de las mutaciones de barrido. En Sambrook *et al.*, 1989 “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, CSH Press, pp. 15.3-15.108; Weiner *et al.*, 1993 *Gene* 126:35-41;

Sayers *et al.*, 1992 *Biotechniques* 13: 592-6; Jones y Winistorfer, 1992 *Biotechniques* 12: 528-30; Barton *et al.*, 1990 *Nucleic Acids Res* 18: 7349-55; Marotti y Tomich, 1989 *Gene Anal. Tech.* 6:67-70; y Zhu 1989 *Anal. Biochem* 177: 120-4, se pueden encontrar procedimientos para la mutagénesis de sitio específico.

## 5 Proteína TRAP

La proteína TRAP puede ser producida mediante cualquier procedimiento adecuado, p.ej., mediante el aislamiento de una bacteria que exprese de forma natural la TRAP, mediante procedimientos recombinantes (p.ej., mediante la expresión de un polinucleótido que tenga una secuencia de SEQ ID N°: 1); mediante procedimientos sintéticos y similares.

En una realización, la TRAP es aislada directamente de una cepa de estafilococo que produce TRAP, p.ej., *S. aureus*. Normalmente, se recogen células de tipo salvaje en un cultivo exponencial (lectura OD como 0,3 a 300 nm). Se centrifugan las células recogidas y se intercambia el medio a PFB para eliminar el <sup>32</sup>P. Entonces se vuelven a suspender las células en agua, se someten a ultrasonidos, se centrifugan para eliminar el material no soluble y se aplica el material soluble a una columna de filtración sobre gel de CLAR. Se aplica la fracción positiva (determinada por la radioactividad máxima y confirmada mediante la separación de una muestra sobre SDS PAGE) a una columna de intercambio iónico de CLAR y se recoge la fracción positiva.

La bacteria staphylococcus de la que se puede aislar la TRAP puede incluir, pero sin limitarse a: *S. aureus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. carnosus*, *S. saprophyticus*, *S. chronii*, *S. simulans*, *S. caseolyticus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. kloosii*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. scruri*, *S. simulans* y *S. xylosus*.

En otra realización, el ácido nucleico codificante de TRAP es empleado para sintetizar una proteína TRAP de longitud completa o fragmentos de la misma, particularmente, fragmentos correspondientes a dominios funcionales (p.ej., sitios de fosforilación que interactúan con RAP, etc.); e incluyendo las fusiones de los polipéptidos de estudio a otras proteínas o partes de las mismas. Para la expresión, se puede emplear un casete de expresión, asegurando una región de iniciación de la transcripción y de la traducción que puede ser inducible o constitutiva, en la que la región codificante esté ligada operativamente bajo el control de la transcripción de la región de iniciación de la transcripción, y una región de terminación de la transcripción y de la traducción. Se pueden emplear diversas regiones de iniciación de la transcripción que sean funcionales en el huésped de expresión.

Los polipéptidos pueden ser expresados en procariotas o eucariotas según procedimientos convencionales, en función del objeto de la expresión. Para una producción a gran escala de la proteína, se puede usar un organismo unicelular, tal como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. cerevisiae*, o células de un organismo superior tal como vertebrados, particularmente, mamíferos, p. ej., células COS 7, como células huésped para la expresión. Alternativamente, se pueden sintetizar fragmentos de TRAP.

Con la disponibilidad de los polipéptidos en grandes cantidades, empleando un huésped de expresión, se puede aislar y purificar la proteína TRAP según procedimientos convencionales. Se puede preparar un lisado del huésped de expresión y se puede purificar éste usando CLAR, cromatografía de exclusión, electroforesis sobre gel, cromatografía de afinidad u otra técnica de purificación. La proteína purificada generalmente tendrá una pureza del al menos aproximadamente 80%, preferiblemente, del al menos aproximadamente 90%, pudiendo ser de una pureza de hasta e incluyendo el 100%.

Las proteínas TRAP pueden ser usadas para la producción de antibióticos, proporcionando los fragmentos cortos anticuerpos específicos de un polipéptido en particular y permitiendo los fragmentos más largos o la proteína entera la producción de anticuerpos sobre la superficie del polipéptido. Los anticuerpos pueden ser cultivados hasta las formas de tipo salvaje o variantes de TRAP. Los anticuerpos pueden ser cultivados hasta los péptidos aislados correspondientes a estos dominios o hasta la proteína nativa, p.ej., mediante la inmunización con células que expresan la TRAP, inmunización con liposomas que tengan la proteína TRAP insertada en la membrana, etc.

## Anticuerpos anti-TRAP

La presente invención también proporciona un anticuerpo que se une específicamente y es inmunorreactivo con TRAP. El anticuerpo puede ser monoclonal, policlonal o humanizado, y se prepara usando procedimientos conocidos en la técnica. En general, los anticuerpos se preparan según procedimientos convencionales, en los que se usa la proteína o una porción antigénica de la misma como inmunogen, sola o conjugada con vehículos inmunogénicos conocidos, p.ej., KLH, pre-S HBsAg, otras proteínas virales o eucariotas, o similares. Se pueden emplear diversos adyuvantes, con una serie de inyecciones, según proceda. Para los anticuerpos monoclonales, tras una o más inyecciones de refuerzo, se aísla el bazo, se immortalizan los linfocitos mediante fusión celular y luego se rastrea en cuanto a la unión de los anticuerpos de alta afinidad. En una realización preferida, se mezclan las células de bazo o de ganglio linfático, y las células de mieloma en una proporción de aproximadamente 20:1 a aproximadamente 1:1, pero preferiblemente, en una proporción de aproximadamente 2:1. Es preferible que la misma especie de animal sirva de fuente de células somáticas o de mieloma usadas en el procedimiento de fusión, cuando el animal sea seleccionado entre rata, ratón, conejo, vaca, pollo, pavo o ser humano. La fusión de las célula somáticas y de mieloma produce un hibridoma, que es cultivado en un cultivo para producir el anticuerpo monoclonal deseado mediante procedimientos estándar. Para obtener una mayor descripción, véase, por ejemplo, "Monoclonal Antibodies: A Laboratory Manual", Harlow y Lane eds., Cold Spring

Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1988. Si se desea, el ARNm que codifica las cadenas pesadas y ligeras puede ser aislado y sometido a mutagénesis mediante la clonación en *E. coli*, mezclándose las cadenas pesadas y ligeras para aumentar la afinidad del anticuerpo. Como alternativas a la inmunización *in vivo* como procedimiento para cultivar anticuerpos, se incluyen la unión a genotecas de “visualización” de fagos, habitualmente en combinación con la maduración de afinidad *in vitro*.

Los anticuerpos policlonales de la presente invención pueden ser producidos inyectando TRAP a una rata, un ratón, un conejo, una vaca, un pollo o un pavo para iniciar una respuesta inmunógena. La TRAP puede ser acoplada a un vehículo proteico tal como hemocianina de la lapa californiana (KLH) o albúmina de suero bovino (ASB). También se puede usar un adyuvante. Tras una cantidad adecuada de tiempo para establecer una alta titulación de los anticuerpos anti-TRAP, se recoge el suero o los huevos. Se puede analizar la presencia de anticuerpo en el suero o en los huevos mediante radioinmunoanálisis (RIA), mediante análisis de inmunoabsorción ligado a una enzima (ELISA) o mediante inmunoprecipitación. Las inmunoglobulinas se pueden aislar mediante procedimientos de precipitación secuencial, mediante procedimientos convencionales de “desalinización” de fracciones proteicas de una solución salina, o mediante procedimientos cromatográficos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

#### *Identificación de agentes adecuados para tratar una infección por estafilococo*

Es de particular interés en la presente invención la identificación de agentes que tengan actividad que afecte a la expresión y/o a la función de TRAP. En general, los agentes de interés son aquellos que 1) inhiben la actividad de TRAP, p.ej., inhibiendo la capacidad de TRAP desfosforilado de convertirse en fosforilado por RAP, o inhibiendo la capacidad de TRAP fosforilado de facilitar la producción de ARNIII; 2) inhiben la actividad de RAP en la interacción con y/o la fosforilación de TRAP; y/o 3) aumentan o imitan la actividad de RIP en la inhibición de TRAP. Tales agentes son candidatos para el desarrollo de tratamientos de la infección de staphylococcus patógenos. Son de particular interés los análisis de rastreo para los agentes que tienen una toxicidad baja para las células humanas y/o una alta especificidad para los staphylococcus, preferiblemente, con poca presión o sustancialmente ninguna para la selección de cepas resistentes a la acción del agente, y sin afectar sustancialmente a la flora normal del huésped (p.ej., como distinguido de antibióticos de amplio espectro).

El término “agente” como se usa en la presente memoria describe cualquier molécula, p.ej., proteína o fármaco, con la capacidad de alterar la actividad de TRAP, o imitar o aumentar la actividad de RIP, según lo descrito anteriormente. Generalmente, se ejecuta una pluralidad de mezclas analíticas en paralelo con diferentes concentraciones de agente para detectar respuestas diferenciales a las diversas concentraciones. Comúnmente, una de estas concentraciones sirve como control negativo, i.e., a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

Los agentes candidatos engloban numerosas clases químicas, aunque normalmente son moléculas orgánicas, preferiblemente, compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 50 y menos de aproximadamente 2.500 daltons. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente, enlaces de hidrógeno, e incluyen comúnmente al menos un grupo amino, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente, al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos habitualmente comprenden estructuras de carbono cíclicas o estructuras heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas por uno o más de los anteriores grupos funcionales. Los agente candidatos también se encuentran entre las biomoléculas, incluyendo, pero no limitándose a: péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, feromonas, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Los agentes candidatos se obtienen de una amplia variedad de fuentes incluyendo genotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, hay numerosos procedimientos disponibles para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorizados. Alternativamente, hay disponibles o se pueden producir fácilmente genotecas de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos (p.ej., estafilococo no patógeno), de hongo, vegetales y animales. Adicionalmente, se pueden modificar fácilmente a través de procedimientos químicos, físicos y bioquímicos convencionales las genotecas y los compuestos naturales o producidos sintéticamente, y pueden usarse para producir genotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden ser sometidos a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc. para producir análogos estructurales.

#### *Rastreo de los agentes candidatos*

Se puede usar una amplia variedad de análisis *in vitro* para rastrear los agentes candidatos, incluyendo análisis de unión *in vitro* marcados, p.ej., unión proteína-proteína, análisis de unión proteína-ADN, análisis de cambio de movilidad electroforética, inmunoanálisis para la unión de proteínas y similares. Se pueden usar proteínas TRAP, RAP y RIP recombinantes o naturales purificadas y/o péptidos o fragmentos de TRAP, RAP y/o RIP producidos sintéticamente en diversos análisis de rastreo para identificar los ligandos o los sustratos que se unen a, modulan (p.ej., aumentan o inhiben) o imitan la acción de las proteínas nativas. Las proteínas purificadas también pueden ser usadas para determinar la estructura cristalina tridimensional, que puede ser usada para modelizar interacciones intermoleculares, la regulación de la transcripción, etc.

El análisis de rastreo puede ser un análisis de unión, en el que se pueden unir una o más de las moléculas a una etiqueta, proporcionando la etiqueta directa o indirectamente una señal detectable. Diversas etiquetas incluyen ra-

diisótopos, fluorescentes, quimioluminiscentes, enzimas, moléculas de unión específica, partículas, p.ej., partículas magnéticas, y similares. Las moléculas de unión específica incluyen parejas, tales como biotina y estreptavidina, digoxina y antidigoxina, etc. Para los miembros de unión específica, el miembro complementario estaría normalmente marcado con una molécula que proporcionara la detección según procedimientos conocidos. En general, el tipo concreto de análisis de rastreo empleado preferiblemente será uno que se adapte al rastreo simultáneo en paralelo de un gran número de agentes candidatos.

Debido a que TRAP, RAP y RIP participan en una ruta de transducción de señales que implica la actividad en la fosforilación (por RAP) o la inhibición de la fosforilación (por RIP) de TRAP, un análisis de rastreo de particular interés supone la detección de la fosforilación de TRAP. Los análisis de rastreo de la fosforilación de TRAP pueden ser realizados en, por ejemplo, un análisis libre de células (p.ej., con proteínas sustancialmente purificadas), en análisis de células enteras (p.ej., usando staphylococcus enteros o células huésped recombinantes que expresan TRAP, RAP y/o RIP). Los análisis de rastreo de la fosforilación pueden ser realizados en una variedad de formas. Por ejemplo, se puede combinar el agente candidato con fosfato marcado detectablemente, TRAP y concentraciones variables de RAP para determinar si el agente candidato compite con RAP en la inhibición de la fosforilación de TRAP por RAP. Alternativamente, se puede combinar el agente candidato con fosfato marcado detectablemente, RAP, TRAP y concentraciones variables de RIP para determinar si el agente candidato imita la actividad de RIP. Los análisis, y los procedimientos para realizar tales análisis, que pueden ser usados en el análisis de rastreo de la invención son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Roychoudhury *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 965-969 (1993), que describe la identificación de los compuestos que bloquean la expresión del alginato, un factor de virulencia para el patógeno de la fibrosis quística *Pseudomonas aeruginosa*, y cuya referencia está incorporada en la presente memoria por referencia con respecto a los análisis de rastreo de fármacos, y los procedimientos y las composiciones para realizar los mismos.

Los análisis de rastreo de la presente invención también engloban los análisis que examinan el efecto de los agentes candidatos en los papeles de TRAP, RAP y RIP en la producción de ARNIII y/o en la producción de factores de virulencia. Por ejemplo, el agente candidato puede ser puesto en contacto con un estafilococo patógeno y comparar los niveles de fosforilación de TRAP y/o de transcripción de ARNIII en presencia del agente con los niveles de fosforilación de TRAP y/o de transcripción de ARNIII en presencia de RIP, RAP y/o una combinación de RIP y RAP. Tales análisis de rastreo pueden utilizar células huésped recombinantes que contienen sistemas de genes indicadores tales como CAT (acetiltransferasa de cloranfenicol),  $\beta$ -galactosidasa y similares asociados operativamente con ARNIII o con los genes de los factores de virulencia para facilitar la detección de ARNIII o la transcripción de los genes de virulencia, o para facilitar la detección de ARNIII o la producción de factores de virulencia. Alternativamente, el análisis de rastreo puede detectar ARNIII o la transcripción de factores de virulencia usando técnicas de hibridación (p.ej., de transferencia northern, PCR, etc.) conocidas en la técnica.

Se puede incluir una variedad de otros reactivos en los análisis de rastreo descritos en la presente memoria. Cuando el análisis es un análisis de unión, éstos incluyen reactivos como sales, proteínas neutras, p.ej., albúmina, detergentes, etc. que son usados para facilitar la unión óptima proteína-proteína, la unión proteína-ADN y/o reducir las interacciones inespecíficas o de fondo. Se pueden usar reactivos que mejoren la eficacia del análisis, tales como inhibidores de la proteasa, inhibidores de la nucleasa, agentes antimicrobianos, etc. La mezcla de los componentes se añade en cualquier orden que proporcione la unión necesaria. Las incubaciones son realizadas a cualquier temperatura adecuada, comúnmente entre 4°C y 40°C. Los períodos de incubación son seleccionados para una actividad óptima, pero también pueden ser optimizados para facilitar un rastreo rápido de alto rendimiento. Comúnmente, bastará con de 0,1 a 1 hora.

#### Rastreo de los agentes candidatos en un modelo animal

Los agentes que tienen una actividad deseada según lo determinado por los análisis descritos anteriormente pueden ser rastreados en mayor profundidad en cuanto a su capacidad para afectar a la producción de los factores de virulencia de staphylococcus y afectar a la infección por staphylococcus en un modelo animal no humano. El modelo animal seleccionado variará con un número de factores incluyendo, pero no limitándose a, la cepa patógena concreta de estafilococo contra la que van a ser rastreados los agentes candidatos, el huésped final para el que van a servir los agentes candidatos como agentes terapéuticos, etc. Los animales adecuados para su uso en los análisis de rastreo incluyen cualquier animal susceptible a la infección por la especie de estafilococo seleccionada. Por ejemplo, cuando la especie de estafilococo es *S. aureus*, el modelo animal puede ser un modelo de roedor, preferiblemente, un modelo de ratón.

En general, el agente candidato es administrado a un animal no humano susceptible a la infección por estafilococo, habiendo sido el animal previamente infectado con estafilococo o recibiendo una dosis infecciosa de estafilococo en combinación con el agente candidato. Preferiblemente, el animal no tiene anticuerpos de RAP detectables. El agente candidato puede ser administrado de cualquier manera deseada y/o apropiada para la administración del agente con el fin de alcanzar el resultado deseado. Por ejemplo, el agente candidato puede ser administrado por inyección (p.ej., por inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea o directamente en el tejido en el que se vaya a conseguir el efecto deseado), tópicamente, oralmente o mediante cualquier otro procedimiento deseado. Normalmente, este rastreo supondrá que un número de animales reciban cantidades y concentraciones variables del agente candidato (desde ningún agente hasta una cantidad de agente que se acerque a un límite superior de la cantidad que pueda ser administrada satisfactoriamente al animal) y puede incluir la administración del agente en diferentes formulaciones. Los agentes pueden ser administrados individualmente o pueden ser combinados en combinaciones de dos o más, especialmente, cuando la administración de una combinación de agentes pueda dar como resultado un efecto sinérgico.

El efecto de la administración del agente en el modelo animal puede ser monitorizado mediante cualquier procedimiento adecuado, tal como la evaluación del número y del tamaño de lesiones asociadas con el estafilococo, la salud general, etc. Cuando el agente candidato afecta a la infección por estafilococo de una manera deseable (p.ej., reduciendo la carga infecciosa, facilitando la regresión de las lesiones, etc.), el agente candidato es identificado como un agente adecuado para su uso en el tratamiento de la infección por estafilococo.

#### *Agentes candidatos identificados*

Los compuestos que tienen la actividad farmacológica deseada pueden ser administrados en un vehículo fisiológicamente aceptable a un huésped para el tratamiento de infección por staphylococcus patógenos. Los agentes terapéuticos pueden ser administrados en una variedad de modos, oral, tópica, parenteralmente, p.ej., subcutánea, intraperitoneal, intravascularmente, por inhalación intrapulmonar, etc. En función de la manera de la introducción, los compuestos pueden ser formulados en una variedad de modos. La concentración del compuesto terapéuticamente activo de la formulación puede variar del aproximadamente 0,1-100% en peso.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser preparadas de diversas formas, tales como gránulos, comprimidos, píldoras, supositorios, cápsulas, suspensiones, bálsamos, lociones y similares. Los vehículos y/o los diluyentes orgánicos o inorgánicos de calidad farmacéutica adecuados para un uso oral y tópico pueden ser usados para formar composiciones que contengan compuestos terapéuticamente activos. Los diluyentes conocidos en la técnica incluyen medios acuosos, aceites y grasas vegetales y animales. Los agentes estabilizadores, agentes humectantes y emulsionantes, las sales para variar la presión osmótica o los tampones para asegurar un valor adecuado de pH, así como los potenciadores de la penetración cutánea pueden ser usados como agentes auxiliares.

#### *Tratamiento de la infección por estafilococo*

La invención proporciona un procedimiento para prevenir o tratar a un ser humano o un animal susceptible a la infección por un estafilococo patógeno (p.ej., *S. aureus* en seres humanos) administrando un agente que inhiba la actividad de TRAP en la facilitación de la producción de los factores de virulencia, p.ej., mediante la inhibición de la fosforilación de TRAP y/o mediante la inhibición de la actividad de TRAP fosforilada en la mediación de la expresión de ARNIII y la posterior producción de los factores de virulencia.

En una realización, el huésped es tratado mediante la administración de un inhibidor de TRAP, tal como un anticuerpo anti-TRAP. En una realización, el inhibidor de TRAP es coadministrado con otros inhibidores de TRAP y/o coadministrado con otros inhibidores de la producción de los factores de virulencia de *S. aureus*, p.ej., coadministrado con RIP. En otra realización, se administran un inhibidor de TRAP, RIP, y un inhibidor de RAP (p.ej., un anticuerpo anti-RAP). Tales terapias de combinación (p.ej., la administración de múltiples agentes inhibidores de TRAP; la administración de TRAP y RIP; y/o la administración de inhibidor de TRAP, RIP, y/o inhibidor de RAP) pueden suponer la coadministración o la administración consecutiva de los componentes activos. El régimen posológico puede ser ajustado para que proporcione la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o la dosis puede ser reducida proporcionalmente según lo indicado por la situación terapéutica. Los compuestos activos pueden ser administrados de cualquier manera conveniente, tal como por vía oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, bucal, transdérmica o por inhalación.

Las formulaciones compuestas de RIP, inhibidor de TRAP y/o inhibidor de RAP son administradas a una dosis terapéuticamente eficaz, p.ej., una dosis suficiente para mejorar la posibilidad de prevenir o tratar satisfactoriamente la infección. La administración de tal formulación puede ser mediante cualquiera de los modos aceptados de administración para los agentes que tienen utilidades similares, preferiblemente, mediante la administración sistémica.

Los niveles de dosificación humanos para tratar las infecciones son conocidos e incluyen generalmente una dosis diaria de aproximadamente 0,1 a 500,0 mg/kg de peso corporal al día, preferiblemente, de aproximadamente 6,0 a 200,0 mg/kg, y lo más preferible, de aproximadamente 12,0 a 100,0 mg/kg. Generalmente, se busca obtener una concentración en suero de tal formulación que se aproxime o supere los niveles de circulación necesarios para reducir o eliminar cualquier infección en menos de 10 días. Para una administración a una persona de 70 kg, el intervalo posológico sería de aproximadamente 50 mg a 3,5 g al día, preferiblemente, de aproximadamente 100 mg a 2 g al día, y lo más preferible, de aproximadamente 200 mg a 1 g al día. La cantidad de formulación administrada dependerá, por supuesto, del sujeto y de la gravedad de la dolencia, de la manera y del horario de administración, y de la valoración del médico que lo prescriba.

En el empleo de una formulación para el tratamiento de infecciones, se puede usar cualquier modo farmacéuticamente aceptable de administración. Las formulaciones pueden ser administradas bien solas o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo formas de dosificación sólidas, semisólidas, líquidas o de aerosol, tales como, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, polvos, líquidos, geles, suspensiones, supositorios, aerosoles o similares. Las formulaciones también pueden ser administradas en formas de dosificación de liberación sostenida o controlada (p.ej., empleando un sistema de administración bioerosionable de liberación lenta), incluyendo inyecciones de depósito, bombas osmóticas (tales como el implante de Alzet fabricado por Alza), píldoras, parches transdérmicos y transcutáneos (incluyendo parches de electrotransporte) y similares, para una administración prolongada a una velocidad predeterminada, preferiblemente, en formas de dosis unitarias adecuadas para una administración única de las dosis exactas. Las composiciones incluirán comúnmente un vehículo o un excipiente farmacéutico convencional y una

formulación de la invención. Además, estas composiciones pueden incluir otros agentes activos, vehículos, adyuvantes, etc. Generalmente, en función del modo de administración deseado, la composición farmacéuticamente aceptable contendrá del aproximadamente 0,1% al 90%, preferiblemente, del aproximadamente 0,5% al 50% en peso de compuesto activo, siendo el resto excipientes, vehículos etc. farmacéuticamente adecuados. Los procedimientos reales para preparar tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes para aquéllos expertos en la técnica. Por ejemplo, véase, "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, XV edición, 1975.

La administración parental se caracteriza generalmente por la inyección, bien subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa, preferiblemente, subcutánea. Los inyectables pueden ser preparados en formas convencionales, bien como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para la solución o la suspensión en líquido antes de su inyección, o como emulsiones. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y similares. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas por ser administradas pueden contener también cantidades traza de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, potenciadores de la solubilidad, y similares, tales como, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, ciclodextrinas y similares.

El porcentaje de ingrediente activo contenido en tales composiciones parentales depende en gran parte de la naturaleza específica del mismo, así como de las necesidades del sujeto. Sin embargo, se pueden emplear porcentajes de ingrediente activo del 0,01% al 10% en solución, y serán mayores si la composición es un sólido que será posteriormente diluido hasta los porcentajes anteriores. Preferiblemente, la composición comprenderá del 0,2-2% de ingrediente activo en solución.

Un enfoque inventado más recientemente para la administración parental emplea la implantación de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, tal que se mantiene un nivel constante de dosis. Se conocen en la técnica diversas matrices (p.ej., polímeros, geles hidrófilos y similares) para controlar la liberación sostenida y para disminuir progresivamente la velocidad de liberación de los agentes activos. Véanse, las patentes estadounidenses n°: 3.845.770 (que describe bombas osmóticas elementales); 3.995.651; 4.034.756 y 4.111.202 (que describen bombas osmóticas en miniatura); 4.320.759 y 4.449.983 (que describen sistemas osmóticos multicompartimentales denominados bomba osmótica *push-pull* y bomba osmótica *push-melt*); y 5.023.088 (que describe bombas osmóticas diseñadas para la dispensación a intervalos consecutivos de diversas unidades de dosificación).

También se pueden administrar las formulaciones de los componentes activos en el tracto respiratorio como un aerosol de inhalación nasal o pulmonar, o una solución para nebulizador, o como un polvo microfino para inhalación, solos o en combinación con un vehículo inerte tal como lactosa, o con otros excipientes farmacéuticamente aceptables. En tal caso, las partículas de la formulación pueden tener ventajosamente diámetros de menos de 50 micrómetros, preferiblemente, de menos de 10 micrómetros. Véase, p.ej., la patente estadounidense n°: 5.364.838 que revela un procedimiento de administración de insulina que puede ser adaptado a la administración de las formulaciones de la presente invención.

#### Vacunación

La invención proporciona una vacuna para su inoculación a un ser humano o a un animal susceptible a la infección por un estafilococo patógeno (p.ej., *S. aureus*) mediante la administración de TRAP o de una porción antigénicamente eficaz de TRAP, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede comprender opcionalmente un adyuvante. Las formulaciones apropiadas para la estimulación de la respuesta inmune son conocidas en la técnica. En general, el huésped es expuesto al antígeno, tal como TRAP, que perturba el sistema inmunológico del huésped, dando como resultado una respuesta inmune hacia el antígeno. Se puede añadir un adyuvante con el antígeno para aumentar la respuesta inmune al antígeno. La cantidad de polipéptido administrada es una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmune protectora en el huésped. Los procedimientos para determinar tales cantidades apropiadas son habituales y conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar TRAP y/o porciones antigénicamente eficaces de la misma para vacunar a un modelo animal de infección por estafilococo. Las cantidades eficaces en tales modelos animales pueden ser extrapoladas a otros huéspedes (p.ej., ganado, seres humanos, etc.) con el fin de proporcionar una cantidad eficaz para la vacunación.

#### Dispositivos revestidos

La invención proporciona un dispositivo cuya superficie está revestida con una composición que tiene una cantidad de un agente inhibidor de TRAP (p.ej., un anticuerpo anti-TRAP) eficaz para inhibir la producción de los factores de virulencia por un estafilococo patógeno. El dispositivo revestido puede ser cualquier dispositivo que pueda ser asociado con el riesgo de infección o la exposición de un huésped (p.ej., un paciente sometido a una operación, una mujer en edad de menstruación, etc.) a factores de virulencia de estafilococo.

Los dispositivos revestidos englobados en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, catéteres, agujas, instrumentos quirúrgicos (p.ej., escalpelos, esponjas, dilatadores, etc.), vendas y materiales de vendaje (p.ej., gasas, apósitos, etc.), articulaciones artificiales, válvulas cardíacas y tampones. Tales dispositivos tienen tendencia a poner los staphylococcus en contacto con el huésped, o a atraer colonizaciones por bacterias staphylococcus (p.ej., tampones). En tales situaciones, los dispositivos revestidos pueden prevenir o reducir la infección por estafilococo, o prevenir o reducir el desarrollo de síntomas graves asociados con la exposición a los factores de virulencia de staphylococcus.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos son expuestos para proporcionar a aquéllos expertos habituales en la técnica una revelación y una descripción completas de cómo hacer y usar la presente invención, y no pretenden representar o implicar que los experimentos que se presentan a continuación sean todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos por garantizar la exactitud con respecto a los números usados (p.ej., cantidades, temperatura, etc.), pero se debería dar cuenta de algunos errores y desviaciones experimentales. A no ser que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular medio en peso, la temperatura está en grados centígrados y la presión es o está cerca de la presión atmosférica.

### Ejemplo 1

#### *Purificación de TRAP*

Comúnmente, se recogen células de tipo salvaje en cultivo exponencial (lectura de OD como 0,3 a 300 nm). Se centrifugan y sus medios son intercambiados a PFB (tampón libre de fosfato). Se añaden RAP y  $^{32}\text{P}$ , se siguen cultivando las células durante una hora más a 37°C con agitación, se recogen las células y se lavan en PBS para eliminar el  $^{32}\text{P}$ . Entonces se vuelven a suspender las células en agua, se someten a ultrasonidos, se centrifugan para eliminar el material no soluble y se aplica el material soluble a una columna de filtración sobre gel para CLAR en 0,1 x PBS. Se aplica la fracción positiva (determinada por la radiactividad máxima y confirmada mediante la separación de una muestra sobre SDS PAGE) a una columna de intercambio aniónico para CLAR en 0,1 x PBS. Se eluyen las proteínas con un gradiente de NaCl 0-1M en 0,1 x PBS y se recoge la fracción positiva (habitualmente, eluída con NaCl aprox. 0,75M).

### Ejemplo 2

#### *Fosforilación de TRAP por RAP*

Los análisis de fosforilación *in vivo* fueron llevados a cabo usando la proteína aislada en el ejemplo 1. Se incubaron células de *S. aureus* exponenciales tempranas de tipo salvaje durante 1 h en tampón libre de fosfato (PFB) junto con  $^{32}\text{P}$ , con RAP (in PBS) o con PBS solo como control. La RAP usada en el análisis fue obtenida según lo descrito por Balaban *et al.*, *Science* 280: 438-440 (1998). Las células fueron recogidas, aplicadas a SDS PAGE y autorradiografiadas sobre gel. Se escaneó el autorradiograma y se determinó la densidad de las bandas. Los resultados, proporcionados en las fig. 3 y 4, muestran que la RAP provoca la fosforilación específica de la proteína de 21 kDa.

Para determinar si la RAP induce la síntesis de TRAP, así como su fosforilación, se repitió el análisis de fosforilación *in vivo* anteriormente descrito en presencia de 100 µg/ml de cloranfenicol (Cm) e inhibidor de la síntesis proteica. Los resultados de estos experimentos (no mostrados) indicaron que la RAP activa la fosforilación de TRAP en presencia de Cm, lo que sugiere que la RAP activa la fosforilación de TRAP y no la síntesis de TRAP.

Para determinar qué etapa o etapas del crecimiento bacteriano están asociadas con la fosforilación de TRAP por RAP, se cultivaron *S. aureus* de tipo salvaje desde la fase lag a la fase log tardía del crecimiento en presencia de  $\text{P}^{32}$ . Se recogieron las células aplicadas a SDS PAGE, y las autorradiografiadas sobre gel, o la cantidad de ARNIII determinada según lo descrito (Balaban *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92: 1619-1623 (1995)). Los resultados de las fig. 5-7 muestran que la fosforilación máxima de TRAP se alcanzó en la fase exponencial media del crecimiento y que TRAP es desfosforilada hacia la fase log tardía del crecimiento.

### Ejemplo 3

#### *TRAP no es codificada ni regulada por agr*

Para determinar si la fosforilación de TRAP depende de *agr*, se cultivó una cepa sin *agr* RN6911 y de tipo salvaje de *S. aureus* desde la fase lag a la fase log tardía en PFB junto con  $^{32}\text{P}$ . La RN6911 es una cepa mutante que contiene un gen *tetM* en lugar de o en *agr* (Novick *et al.*, *EMBO J.* 12:3967-75 (1993)). Se recogieron 2 x 10<sup>7</sup> células en cada una de las fases media y log tardía, se aplicaron a SDS PAGE, y se autorradiografiaron sobre gel. Como la TRAP fue fosforilada tanto en la cepa de tipo salvaje como en la carente de *agr* (fig. 8), la fosforilación de TRAP es independiente de *agr*. Como en el tipo salvaje, la fosforilación máxima en la cepa sin *agr* se alcanza en la fase exponencial media del crecimiento. Sin embargo, a diferencia de la cepa de tipo salvaje, la TRAP no fue desfosforilada hacia la fase log tardía, lo que sugiere que el propio *agr*, una vez activado en la fase exponencial media, produce un factor que regula secuencia abajo la fosforilación de TRAP.

### Ejemplo 4

#### *La fosforilación de TRAP es inhibida por un octapéptido de agrD*

Se traspasaron sobrenadantes post-exponenciales de *S. aureus* de tipo salvaje (total) a través de una membrana de 3 kDa. Se recogió el flujo a través que contenía el octapéptido codificado por *agrD* (<3). Se usó el material restante para purificar RAP sobre una columna de filtración sobre gel (RAP). Se incubaron las células de *S. aureus*

exponenciales tempranas de tipo salvaje durante 1 h en PFB junto con  $^{32}\text{P}$ , con el total, el octapéptido (<3), la RAP o con PBS (control). El octapéptido, que activa la producción de ARNIII, es formado por *S. aureus* de tipo salvaje y está codificado por *agr*. Se recogieron las células, se aplicaron a SDS PAGE y se autorradiografiaron sobre gel (fig. 9). En la fig. 10, se muestra la densidad relativa de las bandas autorradiografiadas. Las actividades del ARNII en presencia de octapéptido, de sobrenadante total, de RAP y de PBS fueron determinadas en paralelo (fig. 11). Estos datos muestran que el octapéptido de *agrD* inhibe la fosforilación de TRAP.

#### Ejemplo 5

##### 10 *La fosforilación de TRAP es activada por RAP e inhibida por RIP*

Se incubaron células de *S. aureus* exponenciales tempranas de tipo salvaje en PFB con  $^{32}\text{P}$  bien con PBS solo, RIP, RAP o una combinación de RIP y RAP. Se aisló el péptido de RIP nativo de la cepa de staphylococcus coagulasa negativo RN833 según lo descrito en Balaban, *et al.*, *Science* **280**: 438-40 (1998) y contiene la secuencia XSPXTNF (SEQ ID N°: 3). Los péptidos sintéticos pueden incluir péptidos como YSPWTNF (SEQ ID N°: 4), YKPWTNF (SEQ ID N°: 5) e YKPITNF (SEQ ID N°: 6). Se recogieron las células, se aplicaron a SDS PAGE, se autorradiografiaron sobre gel y se determinaron las cantidades relativas de fosforilación de TRAP y los niveles de transcripción de ARNIII (Balaban *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* **92**: 1619-1623 (1995)). La fig. 12 muestra el autorradiograma resultante que muestra los niveles relativos de fosforilación de TRAP. La fig. 13 es un gráfico de barras que muestra la densidad relativa de las bandas asociadas con la fosforilación de TRAP en el autorradiograma de la fig. 12. Los niveles relativos de fosforilación de TRAP (fig. 14) y la transcripción del ARNIII (fig. 15) en presencia de PBS solo (control), de RIP, RAP o RIP y RAP también fueron determinados. Estos datos muestran que la fosforilación de TRAP es inhibida en presencia de RIP y aumentada en presencia de RAP. Además, cuando se combinan RIP y RAP, la presencia de RIP reduce los niveles de fosforilación de TRAP normalmente asociados con RAP.

Sin quedar vinculados a la teoría, los datos presentados en los ejemplos anteriores sugieren una secuencia de activación de ARNIII de dos etapas (resumida en la fig. 16). Durante el crecimiento celular, la RAP (señal A) que es independiente de *agr*, llega hasta su umbral de concentración. Entonces se une a este receptor, provocando una cascada de hechos que conduce a la fosforilación de TRAP. Estos hechos conducen entonces a la regulación secuencia arriba de *sarA* que luego regula secuencia arriba el *agr* (Chien *et al.*, *J. Biol. Chem.* **273**: 2645-2652 (1998)). Una vez activado *agr*, se expresa *agrD*, y se produce y se segrega un octapéptido codificado por *agrD* (señal B). Este péptido se une entonces a su receptor, *AgrC* (Line *et al.*, *Mol. Microbiol.* **28**: 655-662 (1998)), lo que resulta en la fosforilación de *AgrC*, la regulación secuencia abajo de la fosforilación de TRAP, la regulación secuencia arriba de P3 y la transcripción de ARNIII. El ARNIII induce los genes que codifican los factores de virulencia que conducen a la producción de las toxinas. RIP actúa como antagonista, bloqueando la unión de RAP a su receptor. Por lo tanto, en presencia de RIP, TRAP no es fosforilada, la transducción de señales de virulencia no es activada, el ARNIII no es producido y las toxinas reguladas por ARNIII no son producidas.

#### Ejemplo 6

##### 40 *La TRAP es fosforilada por histidina*

Los sistemas de dos componentes actúan a través de la fosforilación del dominio del sustrato de la proteína sensora y posteriormente realizan la transferencia del fosfato a un residuo de aspartato de la proteína reguladora. La fosforilación inicial es catalizada por un dominio quinasa de la proteína histidina en la proteína sensora y resulta en un residuo de histidina *N*-fosforilada que es estable en condiciones alcalinas, pero no en condiciones ácidas (Wei *et al.*, *Methods Enzymol.* **200**: 388-414 (1991)). Para analizar si TRAP puede ser fosforilada por histidina y, por tanto, ser un sensor candidato para RAP, se analizó la TRAP fosforilada en cuanto a su sensibilidad a las condiciones ácidas y básicas. Se incubó TRAP fosforilada a un pH que variaba de 3-10 durante 10 min a temperatura ambiente. Entonces se aplicó la mezcla a SDS PAGE y se autorradiografió sobre gel. Se descubrió que la fosforilación de TRAP era estable a pH 8-10, pero lábil a pH inferiores, lo que sugiere la *N*-fosforilación de una histidina (fig. 17).

#### Ejemplo 7

##### 55 *Clonación y secuenciación de TRAP*

Se produjo y se purificó TRAP marcada con  $^{32}\text{P}$  según lo descrito en el ejemplo 1 anterior. Se separó una muestra de la TRAP aislada mediante SDS-PAGE y se cortó la banda radiactiva, se digirió para producir fragmentos y se determinó la secuencia de aminoácidos. Se secuenciaron dos regiones del terminal C. Se compararon estas secuencias de aminoácidos con la base de datos disponible públicamente del genoma de *S. aureus* procedente de la página Web del Proyecto de Secuenciación del Genoma de *Staphylococcus aureus* en [http://www.genome.ou.edu/staph\\_blast.html](http://www.genome.ou.edu/staph_blast.html). Esta búsqueda identificó el cóntigo 876 que contenía la porción restante de la secuencia codificante y la secuencia promotora.

La secuencia de TRAP y su secuencia de aminoácidos prevista se proporcionan en el listado secuencial como SEQ ID N°: 1 y 2, respectivamente. La secuencia codificante se extiende del codón de metionina inicial que empieza en el nucleótido 64 hasta el codón de terminación en el nucleótido 565. La región promotora se extiende desde los nucleótidos 1 a 40, con el sitio de iniciación de la transcripción en el nucleótido 41, para una 5'UTR de los nucleótidos 1-62. El peso molecular previsto de la proteína TRAP codificada es de 20.280 daltons.

## Ejemplo 8

*Tratamiento con anticuerpos de TRAP*

5 Se producen anticuerpos monoclonales frente a TRAP purificada según lo descrito anteriormente mediante los procedimientos de Kohler y Milstein (*Nature*, 256: 495-497 (1975)) según lo modificado por Galfre *et al* (*Nature*, 266: 550-552 (1977)). Se inyectan 10  $\mu$ g de anticuerpos frente a TRAP purificada con CFA en una primera inyección y con adyuvante de Freund incompleto (ICFA) en la segunda y la tercera inyección subcutáneamente en ratones sin pelo inmu-competentes de 4 semanas de vida los días 0, 7 y 21. A los ratones control se les inyecta bien adyuvante solo o no se les inyecta nada. Se desafían los ratones vacunados y los ratones control el día 31 con  $1,24 \times 10^8$  SD de *S. aureus* subcutáneamente junto don 1 mg de perlas Cytodex® para inducir una infección local. Se mide diariamente el tamaño de las lesiones.

15 Aunque la presente invención haya sido descrita con referencia a las realizaciones específicas de la misma, debería entenderse por los expertos en la técnica que es posible realizar diversos cambios y sustituir con equivalentes sin alejarse del verdadero espíritu y del alcance de la invención. Además, se pueden hacer muchas modificaciones para adaptar una determinada situación, material, composición de la materia, procedimiento, etapa o etapas del procedimiento al objeto, espíritu y alcance de la presente invención. Se pretende que todas esas modificaciones estén comprendidas en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una diana aislada de proteína activadora de ARNIII (proteína TRAP) **caracterizada**:

por un peso molecular de aproximadamente 21 kDa;

por ser obtenible a partir de bacteria staphylococcus y

porque la proteína comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2.

2. La proteína de la reivindicación 1 que se **caracteriza** además por:

ser susceptible a la fosforilación por la proteína activadora de ARNIII (RAP).

3. La proteína de la reivindicación 1, en la que la bacteria staphylococcus es *Staphylococcus aureus*.

4. Una molécula de ácido nucleico aislada constituida por una secuencia codificante para la proteína TRAP, que es la de los residuos de nucleótido 64-565 de SEQ ID N°: 1, o una variante degenerada de la misma.

5. Un anticuerpo inmunorreactivo con TRAP que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2.

6. El anticuerpo de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlinal o un anticuerpo humanizado.

7. El uso de un agente inhibidor de TRAP que es un anticuerpo anti-TRAP según lo definido en la reivindicación 5 ó 6 en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de bacterias staphylococcus.

8. El uso de la reivindicación 7, en el que el medicamento es para su uso en un procedimiento que comprende además:

administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido inhibidor de ARNIII (RIP).

9. El uso de la reivindicación 7, en el que el medicamento es para su uso en un procedimiento que comprende además:

administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inhibidor de RAP, que es un anticuerpo anti-RAP.

10. Un procedimiento para identificar agentes biológicamente activos que modulan la actividad de TRAP, comprendiendo el procedimiento:

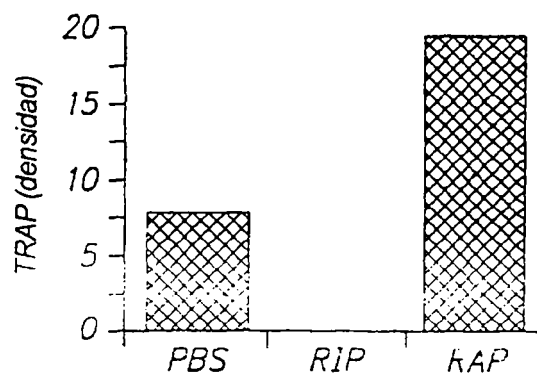
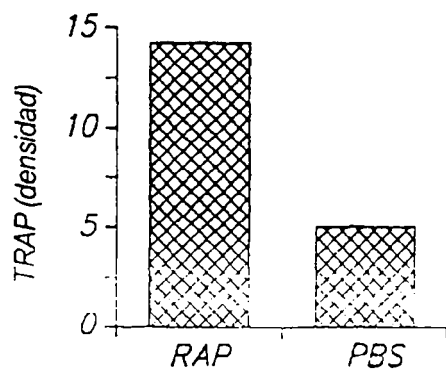
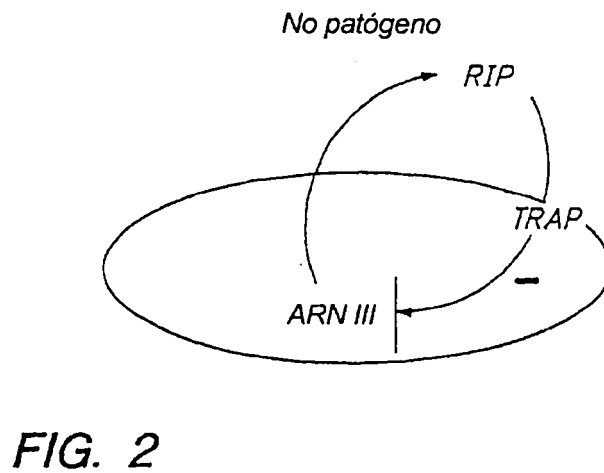
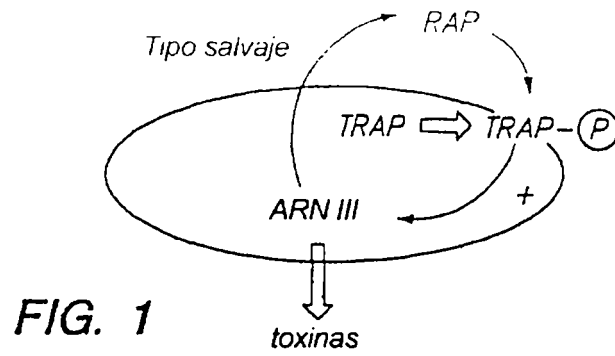
combinar un agente candidato con TRAP que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2 y RAP;

detectar la inhibición de la actividad de TRAP en la producción de los factores de virulencia de estafilococo.

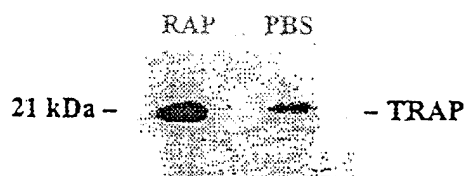
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha detección es mediante la detección de la fosforilación de TRAP.

12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha detección es mediante la detección de la producción de ARNIII.

13. Una vacuna que comprende TRAP, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

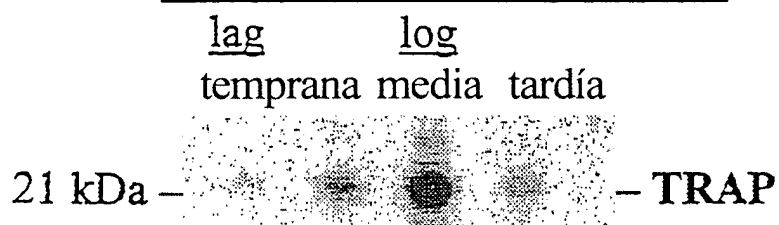


**FIG. 3**

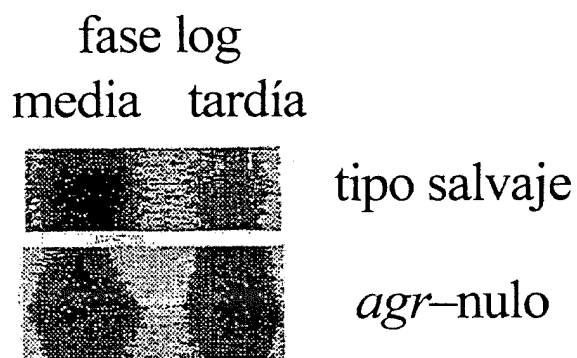


**FIG. 5**

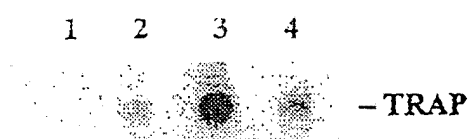
**Fase de crecimiento bacteriano**



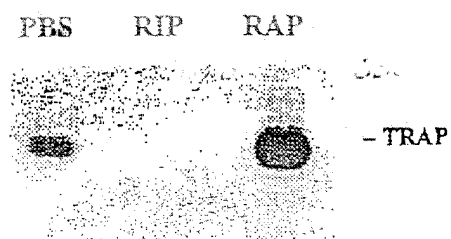
**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 12**



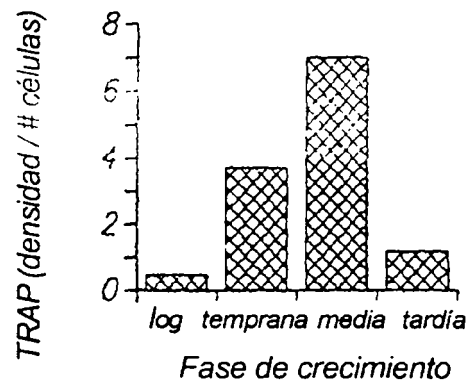


FIG. 6

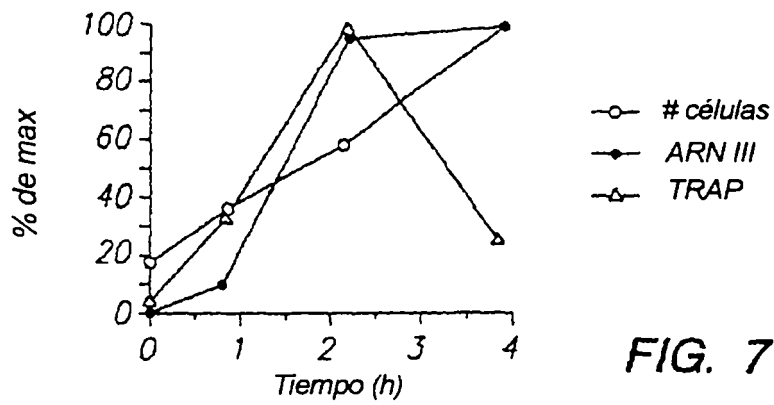
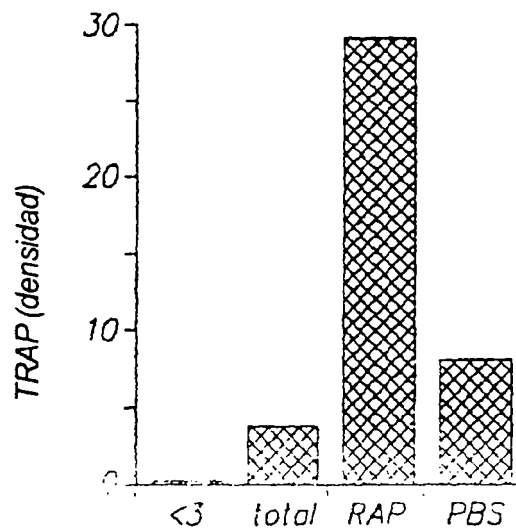


FIG. 7



*S. aureus* + 1. <3 (con octapéptido)

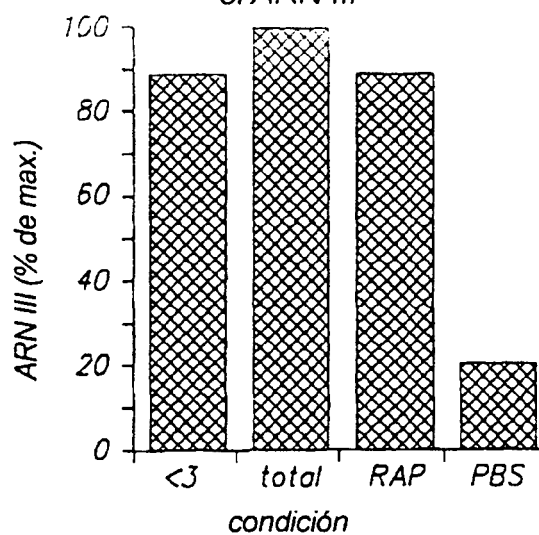
2. sobrenadantes totales (con octapéptido + RAP)

3. RAP

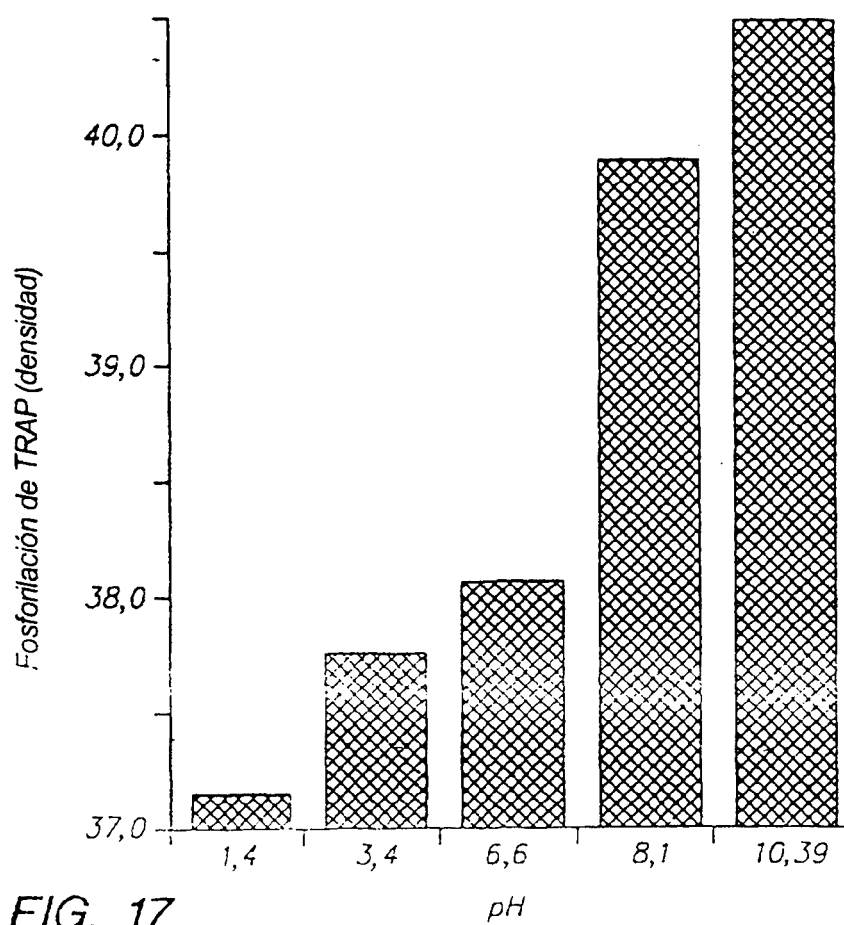
4. PBS

FIG. 10

*Efecto de RAP y del octapéptido en el ARN III*

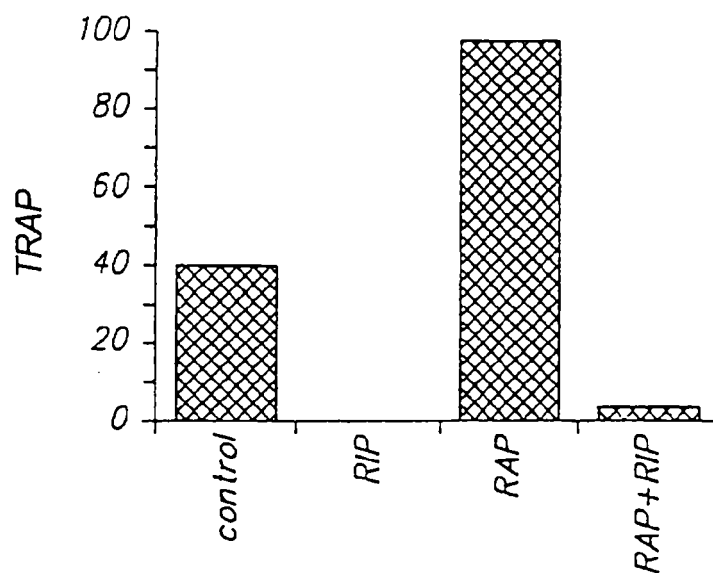


**FIG. 11**



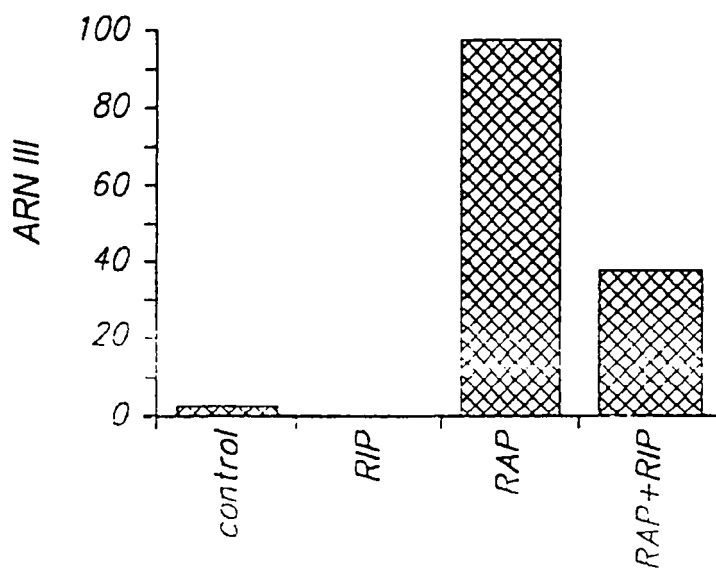
**FIG. 17**

*Efecto de RAP y de RIP en la fosforilación de TRAP*



**FIG. 14**

*Efecto de RAP y de RIP en la transcripción del ARN III*



**FIG. 15**

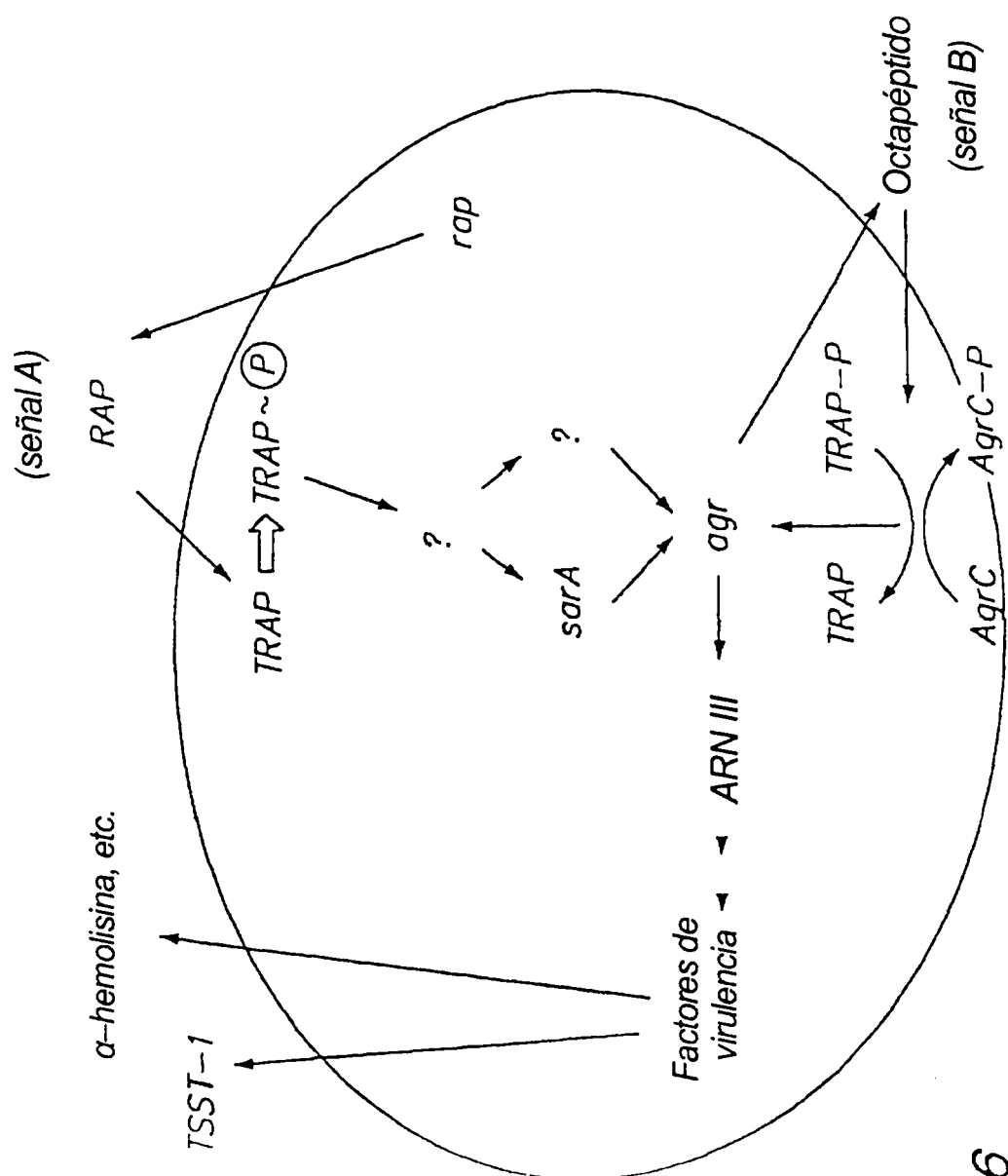


FIG. 16

# ES 2 296 694 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> LOS MIEMBROS DEL CONSEJO RECTOR DE LA UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA

5 <120> DIANA DE LA PROTEÍNA ACTIVADORA DEL ARNIII

<130> N.82362A JHS

10 <140> EP 01122636.2

<141> 13-09-1999

15 <150> US 60/100.415

<151> 15-09-1998

<150> US 09/393.862

20 <151> 10-09-1999

<160> 6

25 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 567

30 <212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

<220>

35 <221> CDS

<222> (64)..(564)

<223>

40

45

50

55

60

65

# ES 2 296 694 T3

<400> 1

|    |                                                                   |     |
|----|-------------------------------------------------------------------|-----|
|    | taatagtggg aatgactagt ttatcatcgt ataataaata aaaacataag ggggaccttt | 60  |
| 5  | cat atg aag aaa cta tat aca tct tat ggc act tat gga ttt tta cat   | 108 |
|    | Met Lys Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Gly Thr Tyr Gly Phe Leu His       |     |
|    | 1 5 10 15                                                         |     |
| 10 | cag ata aaa atc aat aac ccg acc cat caa cta ttc caa ttt tca gca   | 156 |
|    | Gln Ile Lys Ile Asn Asn Pro Thr His Gln Leu Phe Gln Phe Ser Ala   |     |
|    | 20 25 30                                                          |     |
| 15 | tca gat act tca gtt att ttt gaa gaa act gat ggt gag act gtt tta   | 204 |
|    | Ser Asp Thr Ser Val Ile Phe Glu Glu Thr Asp Gly Glu Thr Val Leu   |     |
|    | 35 40 45                                                          |     |
| 20 | aaa tca cct tca ata tat gaa gtt att aaa gaa att ggt gaa ttc agt   | 252 |
|    | Lys Ser Pro Ser Ile Tyr Glu Val Ile Lys Glu Ile Gly Glu Phe Ser   |     |
|    | 50 55 60                                                          |     |
| 25 | gaa cat cat ttc tat tgt gca atc ttc att cca tca aca gaa gat cat   | 300 |
|    | Glu His His Phe Tyr Cys Ala Ile Phe Ile Pro Ser Thr Glu Asp His   |     |
|    | 65 70 75                                                          |     |
| 30 | gca tat caa ctt gaa aag aaa ctg att agt gta gac gat aat ttc aga   | 348 |
|    | Ala Tyr Gln Leu Glu Lys Lys Leu Ile Ser Val Asp Asp Asn Phe Arg   |     |
|    | 80 85 90 95                                                       |     |
| 35 | aac ttt ggt ggc ttt aaa agc tat cgt ttg tta aga cct gct aaa ggt   | 396 |
|    | Asn Phe Gly Gly Phe Lys Ser Tyr Arg Leu Leu Arg Pro Ala Lys Gly   |     |
|    | 100 105 110                                                       |     |
| 40 | aca aca tac aaa att tat ttc gga ttt gct gat cga cat gca tac gaa   | 444 |
|    | Thr Thr Tyr Lys Ile Tyr Phe Gly Phe Ala Asp Arg His Ala Tyr Glu   |     |
|    | 115 120 125                                                       |     |
| 45 | gac ttt aag caa tct gat gcc ttt aat gac cat ttt tca aaa gac gca   | 492 |
|    | Asp Phe Lys Gln Ser Asp Ala Phe Asn Asp His Phe Ser Lys Asp Ala   |     |
|    | 130 135 140                                                       |     |
| 50 | tta agt cat tac ttt ggt tca agc gga caa cat tca agt tat ttt gaa   | 540 |
|    | Leu Ser His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Gln His Ser Ser Tyr Phe Glu   |     |
|    | 145 150 155                                                       |     |
| 55 | aga tat cta tac cca ata aaa gaa tag                               | 567 |
|    | Arg Tyr Leu Tyr Pro Ile Lys Glu                                   |     |
|    | 160 165                                                           |     |

<210> 2

<211> 167

60 <212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

65

# ES 2 296 694 T3

<400> 2

```

Met Lys Lys Leu Tyr Thr Ser Tyr Gly Thr Tyr Gly Phe Leu His Gln
1           5           10           15

Ile Lys Ile Asn Asn Pro Thr His Gln Leu Phe Gln Phe Ser Ala Ser
20           25           30

Asp Thr Ser Val Ile Phe Glu Glu Thr Asp Gly Glu Thr Val Leu Lys
35           40           45

Ser Pro Ser Ile Tyr Glu Val Ile Lys Glu Ile Gly Glu Phe Ser Glu
50           55           60

His His Phe Tyr Cys Ala Ile Phe Ile Pro Ser Thr Glu Asp His Ala
65           70           75           80

Tyr Gln Leu Glu Lys Lys Leu Ile Ser Val Asp Asp Asn Phe Arg Asn
85           90           95

Phe Gly Gly Phe Lys Ser Tyr Arg Leu Leu Arg Pro Ala Lys Gly Thr
100          105          110

Thr Tyr Lys Ile Tyr Phe Gly Phe Ala Asp Arg His Ala Tyr Glu Asp
115          120          125

Phe Lys Gln Ser Asp Ala Phe Asn Asp His Phe Ser Lys Asp Ala Leu
130          135          140

Ser His Tyr Phe Gly Ser Ser Gly Gln His Ser Ser Tyr Phe Glu Arg
145          150          155          160

Tyr Leu Tyr Pro Ile Lys Glu
165

```

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 3

```

Tyr Ser Pro Xaa Thr Asn Phe
1           5

```

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

## ES 2 296 694 T3

<220>

<223> Péptido sintético

5 <400> 4

Tyr Ser Pro Trp Thr Asn Phe  
1 5

10 <210> 5

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

20

<400> 5

Tyr Lys Pro Trp Thr Asn Phe  
1 5

25

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Péptido sintético

<400> 6

40 Tyr Lys Pro Ile Thr Asn Phe  
1 5

45

50

55

60

65