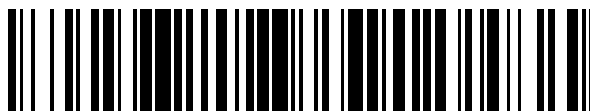


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 341**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01) **A61K 31/7105** (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01) **C07K 16/12** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/18 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 39/085 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2005** **PCT/IB2005/003576**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2017** **WO06021893**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2005** **E 05806350 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2017** **EP 1784220**

54 Título: **Dianas bacterianas de adquisición de hierro**

30 Prioridad:

26.08.2004 US 604769 P

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

21.03.2018

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF WESTERN ONTARIO
(100.0%)
INDUSTRY LIAISON, 1151 RICHMOND STREET
NORTH, STEVENSON-LAWSON BUILDING,
ROOM
LONDON, ONTARIO N6A 5B8, CA**

72 Inventor/es:

**HEINRICHS, DAVID, E. y
DALE, SUZANNE**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 660 341 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dianas bacterianas de adquisición de hierro

5 Antecedentes de la invención

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es un patógeno humano frecuente que causa una amplia gama de infecciones que van desde pequeñas lesiones de la piel, impétigo e intoxicación alimentaria hasta enfermedades más graves tales como septicemia, endocarditis, osteomielitis, neumonía, bacteriemia y síndrome de choque tóxico (Archer (1998) Clin. Infect. Dis. 26: 1179 - 1181). Inicialmente, la penicilina podría utilizarse para tratar incluso las peores infecciones por *S. aureus*. Sin embargo, la aparición de cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina ha reducido la eficacia de la penicilina en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* y la mayoría de las cepas de *S. aureus* que actualmente se presentan en las infecciones hospitalarias no responden a la penicilina. Las cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina producen una lactamasa, que convierte la penicilina en ácido peniciloico y, por lo tanto, destruye la actividad antibiótica. Además, el gen de lactamasa a menudo se propaga de manera episomal, típicamente en un plásmido, y a menudo es solo uno de varios genes en un elemento episomal que, juntos, confieren resistencia a múltiples fármacos.

La meticilina, introducida en la década de 1960, superó en gran medida el problema de la resistencia a la penicilina en *S. aureus*. Estos compuestos conservan las porciones de penicilina responsables de la actividad antibiótica y modifican o alteran otras porciones que hacen que la penicilina sea un buen sustrato para inactivar las lactamasas. Sin embargo, la resistencia a la meticilina ha surgido en *S. aureus*, junto con la resistencia a muchos otros antibióticos eficaces contra este organismo, incluyendo vancomicina, aminoglucósidos, tetraciclina, cloranfenicol, macrólidos y lincosamidas. De hecho, las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina generalmente son resistentes a múltiples fármacos. El *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) se ha convertido en uno de los patógenos nosocomiales más importantes a nivel mundial y presenta serios problemas de control de infecciones. La resistencia a los fármacos de las infecciones por *S. aureus* plantea importantes dificultades de tratamiento; que probablemente empeorarán a menos que se desarrollen nuevos agentes terapéuticos. Por tanto, existe una urgente necesidad médica no satisfecha de agentes terapéuticos nuevos y eficaces para tratar las infecciones por *S. aureus*.

El documento WO 02/094868 divulga, en líneas generales, secuencias de aminoácidos y de nucleótidos de proteínas de *Staphylococcus aureus* incluyendo la FhuC. El documento sugiere que composiciones que comprenden proteínas, anticuerpos y/o ácidos nucleicos divulgados en el mismo, pueden ser adecuadas como composiciones inmunogénicas.

El documento WO 99/47662 divulga once genes de *S. aureus* y los polipéptidos que codifican, incluyendo cbrA, cbrB y cbrC. También se proporcionan vectores, células hospedadoras, anticuerpos y métodos recombinantes para su producción. La divulgación se refiere además a métodos de exploración para identificar agonistas y antagonistas de la actividad polipeptídica de *S. aureus*. La divulgación se refiere adicionalmente a métodos de diagnóstico para detectar, en una muestra biológica, ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos de *Staphylococcus* así como vacunas para la prevención o atenuación de una infección por *Staphylococcus*.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un agente que inhibe una interacción entre proteínas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) seleccionadas del grupo que consiste en SirA y SirB, SirA y SirC, SirB y SirC, SirB y FhuC y SirC y FhuC que comprende:

- (i) poner en contacto las proteínas, o el ácido nucleico que codifica las proteínas, en presencia y en ausencia de un agente, en condiciones que permitan la interacción entre las dos proteínas; y
- (ii) determinar el nivel de interacción entre las proteínas, en el que un nivel de interacción diferente entre las proteínas en presencia del agente en relación a en ausencia del agente, indica que el agente inhibe la interacción entre las proteínas.

En una realización, el agente es una molécula orgánica pequeña, un péptido, un polipéptido, un peptidomimético o un anticuerpo. En una realización, el agente es un polinucleótido, tal como un polinucleótido antisentido. En una realización, el agente es siRNA. El agente puede inhibir la interacción entre FhuC y SirB o SirC.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un agente para inhibir el crecimiento de células de *S. aureus*, en donde el agente se hibrida o se une específicamente con ARNm o ADN genómico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

También se divulgan nuevos antibióticos, que incluyen anticuerpos, ARN antisentido y siRNA que inhiben la absorción de hierro en *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Se describen ensayos de exploración para identificar agentes que inhiben la absorción de hierro en *S. aureus*. El ensayo puede identificar agentes que inhiben la

interacción entre SirA, SirB, SirC, estafilobactina y/o FhuC.

El ensayo puede identificar agentes que inhiben la expresión de polipéptidos y/o ácidos nucleicos *Sir* en *S. aureus*. El ensayo puede ser un ensayo fenotípico que puntúa el crecimiento de *S. aureus* en medios repletos de hierro en presencia del compuesto de ensayo con respecto a la ausencia del compuesto de ensayo.

Ahora se analizarán otras características y ventajas de las presentes invenciones divulgadas junto con la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la organización genética del locus *sbn-sirABC*. Se indican los tres marcos de lectura abiertos del operón *sir* así como el primer gen del operón *sbn* (*sbnA*). Se muestran las posiciones de los sitios de inserción utilizados para alterar las regiones codificantes *sirA* y *sirB*, generando las cepas H803 y H804, respectivamente, en el acervo de la cepa Newman de *S. aureus*. Se muestran los plásmidos pSED43 y pSED44, utilizados para la complementación de las mutaciones *sirB*::tet y *sirA*::Km, respectivamente.

La Figura 2 es una inmunotransferencia que muestra la expresión de SirA regulada por hierro y Fur en *S. aureus* Newman y su derivado *fur*::Km. Las células se cultivaron en medios ricos en hierro (TSB, TMS + Fe) o restringidos en hierro (TMS, TMS + Dip), se normalizaron por densidad óptica y se sometieron a lisis. Se detectó SirA en lisados celulares con antisuero policlonal de conejo dirigido a SirA.

La Figura 3 muestra gráficos que comparan el crecimiento de *S. aureus* Newman frente a un derivado mutante *sirA*::Km (A) o un derivado mutante *sirB*::Tet (B) en caldo de TMS que contiene 2,2'-dipiridilo 250 µM y FeCl₃ 50 µM (recuadro) o 2,2'-dipiridilo 250 µM. ■, Newman; □, H803 (*sirA*::Km); ▲, Newman portando el vector pAW8; △, H803 portando pAW8; ◆, H803 portando pSED44, cultivado sin IPTG; ○, H803 portando pSED44 cultivado con IPTG 1 mM; ○, H804 (*sirB*::Tet); ▼, H804 portando pSED43. Los datos son representativos de tres experimentos.

La Figura 4 es un diagrama esquemático que muestra el reemplazo alélico de *fhuCBG* en el genoma RN6390 de *S. aureus*. Las regiones flanqueantes de *fhuCBG*, *fhuC'* y *fhuG*, se amplificaron del cromosoma RN6390, se ligaron a cada lado de *ermB* y se clonaron en el vector lanzadera pAUL-A-Km, sensible a temperatura. Esta construcción permitió el reemplazo de *fhuCBG* por *ermB* en el genoma RN4220 por recombinación homóloga. La transducción de fagos se utilizó para movilizar la mutación en los acervos RN6390 y Newman para producir las cepas H1071 y H1074, respectivamente. Se indican los tamaños de los fragmentos de ADN relevantes.

La Figura 5 es un gráfico que muestra el transporte de hierro mediado por ⁵⁵Fe-estafilobactina por derivados de *S. aureus* RN6390 y H1071, cultivados en TMS que contiene 2,2'-dipiridilo 50 µM. ●, RN6390; ○, H1071 + pFhuC; ▼, H1071 + pFhuCBG. RN6390 (▽), H1071 + pFhuC (■) y H1071 + pFhuCBG (□) todos ellos tratados con KCN 20 mM 15 minutos antes del ensayo. Recuadro: Cepas (◆, RN6390; ◇, H1071) cultivadas antes del ensayo en TMS sin 2,2'-dipiridilo, que se realizó porque la cepa H1071 sin plásmidos complementarios no crece bien en presencia de 2,2'-dipiridilo, sin embargo, en este experimento, la cepa RN6390 no está tan privada de hierro como cuando se cultiva en presencia de 2,2'-dipiridilo 50 µM. Cada punto representa los pmoles de ⁵⁵Fe transportados por 2 x 10⁸ células de la mezcla de ensayo.

La Figura 6 muestra la secuencia del ácido nucleico del operón SirABC correspondiente al número de acceso a GenBank AF079518 (SEQ ID NO: 1) y su complemento inverso (SEQ ID NO: 2).

La Figura 7 muestra (A) el ácido nucleico (SEQ ID NO: 3), (B) el complemento inverso de SEQ ID NO: 3 (SEQ ID NO: 4) y (C) la secuencia de aminoácidos de SirA (SEQ ID NO 5).

La Figura 8 muestra (A) el ácido nucleico (SEQ ID NO: 6), (B) el complemento inverso de SEQ ID NO: 6 (SEQ ID NO: 7) y (C) la secuencia de aminoácidos de SirB (SEQ ID NO: 8).

La Figura 9 muestra (A) el ácido nucleico (SEQ ID NO: 9), (B) el complemento inverso de SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 10) y (C) la secuencia de aminoácidos de SirC (SEQ ID NO: 11).

La Figura 10 muestra el ácido nucleico del operón FhuCBG correspondiente al número de acceso a GenBank AF251216 (SEQ ID NO: 12) y su complemento inverso (SEQ ID NO: 13).

La Figura 11 muestra (A) el ácido nucleico (SEQ ID NO: 14), (B) el complemento inverso de SEQ ID NO: 14 (SEQ ID NO: 15) y (C) la secuencia de aminoácidos de FhuC (SEQ ID NO: 16).

Descripción detallada

1. General

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento del papel del complejo *sirABC* de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) en el transporte del sideróforo de hierro, estafilobactina, así como en la identificación de *fhuC*, como codificante de una ATPasa necesaria para la absorción de estafilobactina a través del transportador SirABC. En este documento se describen nuevos antibióticos que inhiben la absorción de hierro en *S. aureus* y métodos para evaluar compuestos para identificar inhibidores adicionales del sistema SirABC de transporte de sideróforo de hierro SirABC.

2. Definiciones

Por conveniencia, a continuación se proporciona el significado de ciertos términos y frases que se emplean en la memoria descriptiva, en los ejemplos y en las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

En el presente documento, el término "agente" se utiliza para designar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica (tal como un ácido nucleico, un anticuerpo, una proteína o una porción de la misma, por ejemplo, un péptido) o un extracto elaborado con materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos animales (particularmente mamíferos). Los agentes se pueden identificar mediante ensayos de exploración descritos a continuación en este documento. Dichos agentes pueden ser inhibidores o antagonistas del transporte de hierro mediado por SirABC en *Staphylococcus aureus*. La actividad de dichos agentes puede hacer que sea adecuado como un "agente terapéutico" que es una sustancia (o sustancias) biológica, fisiológica o farmacológicamente activa que actúa local o sistémicamente en un sujeto.

Los términos "antagonista" o "inhibidor" se refieren a un agente que reduce o inhibe al menos una bioactividad de una proteína. Un antagonista puede ser un compuesto que reduce o inhibe la interacción entre una proteína y otra molécula, por ejemplo, un péptido diana o sustrato enzimático. Un antagonista también puede ser un compuesto que reduce o inhibe la expresión de un gen o que reduce o inhibe la cantidad de proteína expresada presente.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina y a cualquier porción de unión a un antígeno de una inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgD, IgA, IgM e IgE), es decir, un polipéptido que contiene un sitio de unión a un antígeno, que se une específicamente ("inmunoreacciona con") a un antígeno. Los anticuerpos pueden comprender al menos una cadena pesada (H, *heavy*) y al menos una cadena ligera (L, *light*) interconectadas por al menos un enlace disulfuro. El término " V_H " se refiere a una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo. El término " V_L " se refiere a una región variable de una cadena ligera de un anticuerpo. En realizaciones ilustrativas, el término "anticuerpo" incluye específicamente anticuerpos monoclonales y policlonales. Un "anticuerpo policlonal" se refiere a un anticuerpo que se ha obtenido de los sueros de animales inmunizados con uno o más antígenos. Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo producido por un solo clon de células de hibridoma. Las técnicas para generar anticuerpos monoclonales incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma (véase Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497); la técnica de trioma; la técnica del hibridoma de células B humanas (véase Kozbor et al., (1983) *Immunol. Today* 4:72), la técnica del hibridoma EBV (véase Cole et al., 1985 En: *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc, págs. 77-96) y presentación en fagos.

Los anticuerpos policlonales o monoclonales pueden manipularse o modificarse adicionalmente para generar anticuerpos quiméricos o humanizados. Los "anticuerpos quiméricos" están codificados por genes de inmunoglobulina que se han modificado genéticamente de modo que los genes de cadena ligera y pesada están compuestos por segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, porciones sustanciales de los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón, por ejemplo, obtenidos como se describe en este documento, se pueden unir a porciones sustanciales de segmentos constantes (C) humanos. Dicho anticuerpo quimérico probablemente sea menos antigénico para un ser humano que un anticuerpo monoclonal de ratón.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" (HuAb, *humanized antibody*) se refiere a un anticuerpo quimérico con una región estructural sustancialmente idéntica (es decir, al menos 85%) a una región estructural humana, que tiene las CDR de un anticuerpo no humano, y en el que cualquier región constante tiene al menos aproximadamente 85-90%, y preferiblemente aproximadamente 95% de identidad de secuencia polipeptídica, con una región constante de inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 90/07861 y la Patente Europea No. 0451216. Todas las partes de dicho HuAb, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana nativa. El término "región estructural" tal como se usa en este documento, se refiere a aquellas regiones variables de cadena ligera y pesada de porciones de inmunoglobulina que están relativamente conservadas (es decir, además de las CDR) entre diferentes inmunoglobulinas en una sola especie, como definen Kabat et al. (1987) *Sequences of Proteins of Immunologic Interest*, 4ª Ed., US Dept. Health and Human Services. Las secuencias de la región constante de ADN humano se pueden aislar de acuerdo con procedimientos bien conocidos a partir de una variedad de células humanas, pero preferiblemente de células B inmortalizadas. Las regiones variables o CDR para producir anticuerpos humanizados pueden derivar de anticuerpos monoclonales capaces de unirse al antígeno, y se producirán en cualquier mamífero conveniente, que incluye ratones, ratas, conejos u otros vertebrados.

El término "anticuerpo" también incluye fragmentos de anticuerpos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y fragmentos Fv; diacuerpos y cualquier fragmento de anticuerpo que tiene una estructura primaria que consiste en una secuencia ininterrumpida de restos de aminoácidos contiguos, que incluyen sin limitación: moléculas de Fv monocatenarias (scFv, *single-chain* Fv), polipéptidos monocatenarios que contienen solo un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDR del dominio variable

de cadena ligera, sin un residuo de cadena pesada asociado y (3) polipéptidos monocatenarios que contienen solo una región variable de cadena pesada, o un fragmento de la misma que contiene las tres CDR de la región variable de cadena pesada, sin un residuo de cadena ligera asociado; y estructuras multiespecíficas o multivalentes formadas a partir de fragmentos de anticuerpos. En un fragmento de anticuerpo que comprende una o más cadenas pesadas, la(s) cadena(s) pesada(s) puede(n) contener cualquier secuencia de dominio constante (por ejemplo, CH1 en el isotipo de IgG) encontrada en una región no Fc de un anticuerpo intacto, y/o puede contener cualquier secuencia de la región bisagra encontrada en un anticuerpo intacto, y/o puede contener una secuencia cremallera de leucina fusionada con, o situada en, la secuencia de la región bisagra o la secuencia de dominio constante de la(s) cadena(s) pesada(s). Secuencias cremallera de leucina adecuadas incluyen las cremalleras de leucina jun y fos descritas por Kostelny et al., (1992) J. Immunol., 148: 1547-1553 y la cremallera de leucina GCN4 descrita en la Patente de Estados Unidos N°. 6.468.532. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto y se producen típicamente por escisión proteolítica, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F (ab')₂).

Un anticuerpo se "une específicamente" a un antígeno o a un epítipo de un antígeno si el anticuerpo se une preferiblemente al antígeno frente a la mayoría de los otros antígenos. Por ejemplo, el anticuerpo puede tener UNA reactividad cruzada menor de aproximadamente 50%, 20%, 10%, 5%, 1% o 0,1% hacia uno o más epítopos distintos.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para producir un resultado clínico beneficioso o deseado después del tratamiento. Se puede administrar una cantidad eficaz a un paciente en una o más dosis. En términos de tratamiento, una cantidad eficaz es una cantidad que es suficiente para disminuir una infección en un paciente. Generalmente, para conseguir una cantidad eficaz, se tienen en cuenta varios factores cuando se determina una dosificación apropiada. Estos factores incluyen la edad, el sexo y el peso del paciente, la afección que se está tratando, la gravedad de la afección y la forma y concentración eficaces del agente administrado.

"Equivalente", cuando se usa para describir secuencias de ácidos nucleicos o de nucleótidos, se refiere a secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos funcionalmente equivalentes. Las secuencias de nucleótidos equivalentes incluirán secuencias que difieren en una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos, tales como una variante alélica; y, por lo tanto, incluirá secuencias que difieren debido a la degeneración del código genético. Por ejemplo, las variantes de ácido nucleico pueden incluir las producidas por sustituciones, deleciones o adiciones de nucleótidos. Las sustituciones, deleciones o adiciones pueden implicar uno o más nucleótidos. Las variantes pueden alterarse en regiones codificantes, regiones no codificantes, o en ambas. Las alteraciones en las regiones codificantes pueden producir sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservativas o no conservativas.

Como se usa en este documento, la expresión "sistema de absorción de hidroxamato férrico" o "sistema *fhu*" se refiere a un grupo de genes que codifica un transportador de ABC. El sistema *fhu* está codificado por cinco genes. *FhuC*, *fhuB* y *fhu G* están presentes en un operón (operón *fhuCBG*) y codifica componentes de un transportador de casete de unión a ATP (ABC, *ATP-binding cassette*). *FhuD1* y *fhuD2* se codifican por separado y codifican lipoproteínas que unen complejos de hidroxamato férrico con alta afinidad. Pueden encontrarse ejemplos de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para el operón *fhuCBG* en GenBank, No. de acceso AF251216, AAF98153, AAF98154 y AAF98155; para *fhuD1*, No. de acceso AF325854 y AAK92085; y para *fhuD2* AF325855 y AAK92086. Los términos "FhuC", "FhuB", "FhuG", "FhuD1" y "FhuD2" incluyen fragmentos o porciones de los mismos y fragmentos o porciones biológicamente activos de los mismos.

"Homología" o, como alternativa, "identidad", se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología puede determinarse comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse con fines comparativos. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre secuencias es una función del número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las secuencias. La expresión "porcentaje de identidad" se refiere a la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. La identidad puede determinarse comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse con fines comparativos. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por el mismo resto de aminoácido o uno similar (por ejemplo, similar en naturaleza estérica y/o electrónica), entonces las moléculas pueden denominarse homólogas (similares) en esa posición. La expresión, como un porcentaje de homología, similitud o identidad, se refiere a una función del número de aminoácidos idénticos o similares en posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Se pueden utilizar diversos algoritmos y/o programas de alineamiento, incluidos FASTA, BLAST o ENTREZ. FASTA y BLAST están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencia GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), y pueden utilizarse, por ejemplo, con configuraciones predeterminadas. ENTREZ está disponible en el Centro Nacional de Información Biotecnológica, Librería Nacional de Medicina, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. En una realización, el porcentaje de identidad de dos secuencias puede determinarse con el programa GCG con un peso de 1 por espacio, por ejemplo, cada espacio de aminoácido se pondera como si fuera un solo emparejamiento erróneo de aminoácidos o nucleótidos entre las dos secuencias. Otras técnicas de alineamiento se

describen en *Methods in Enzymology*, vol. 266: *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis* (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., una división de Harcourt Brace & Co., San Diego, California, Estados Unidos. Preferiblemente, se utiliza un programa de alineamiento para alinear las secuencias que permite espacios en la secuencia. El algoritmo de Smith-Waterman es un tipo de algoritmo que permite espacios en los alineamientos de secuencias. Véase *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997). Además, el programa GAP, que utiliza el método de alineamiento de Needleman y Wunsch, puede utilizarse para alinear secuencias. Una estrategia de búsqueda alternativa utiliza el programa informático MPSRCH, que se ejecuta en un ordenador MASPAREL. El programa MPSRCH utiliza un algoritmo de Smith-Waterman para puntuar secuencias en un ordenador de cálculo paralelo masivo. Esta estrategia mejora la capacidad de detectar coincidencias distantes relacionadas y es especialmente tolerante con espacios pequeños y errores de secuencias de nucleótidos. Las secuencias de aminoácidos codificadas por ácidos nucleicos pueden utilizarse para buscar bases de datos tanto de proteínas como de ADN. Las bases de datos con secuencias individuales se describen en *Methods in Enzymology*, ed. Doolittle, citado anteriormente. Las bases de datos incluyen Genbank, EMBL y la base de datos de DNA de Japón (DDBJ, *DNA Database of Japan*).

Como se usa en el presente documento, el término "infección" se refiere a una invasión y multiplicación de microorganismos tales como *S. aureus* en tejidos corporales, que pueden ser clínicamente no visibles o dar como resultado una lesión celular local debido a un metabolismo competitivo, a toxinas, a replicación intracelular o a una respuesta de anticuerpos a antígenos. Si los mecanismos de defensa corporales son eficaces, la infección puede permanecer localizada, subclínica y temporal. Una infección local puede persistir y propagarse por extensión hasta convertirse en una infección clínica o un estado patológico agudo, subagudo o crónico. Una infección local también puede volverse sistémica cuando los microorganismos llegan al sistema linfático o vascular. Una infección de *S. aureus* puede provocar una enfermedad o afección, incluyendo, sin limitación, un furúnculo, forunculosis crónica, impétigo, osteomielitis aguda, neumonía, endocarditis, síndrome de la piel escaldada, síndrome de choque tóxico e intoxicación alimentaria.

El término "inhibir" se refiere a cualquier disminución, reducción o inhibición completa de actividad biológica, expresión de ácido nucleico o expresión de proteína.

"Marcador" y "marcador detectable" se refieren a una molécula con capacidad de detectar, que incluye, pero no limitada a, isótopos radiactivos, fluoróforos, residuos quimioluminiscentes, enzimas, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, colorantes, iones metálicos, ligandos (por ejemplo, biotina o haptenos) y similares. "Fluoróforo" se refiere a una sustancia o a una porción de la misma que es capaz de exhibir fluorescencia en el intervalo detectable. Los ejemplos particulares de marcadores que pueden utilizarse según la invención incluyen fluoresceína, rodamina, dansilo, umbeliferona, rojo de Texas, luminol, NADPH, alfa o beta galactosidasa y peroxidasa de rábano picante.

Tal como se usa en este documento con respecto a genes, el término "mutante" se refiere a un gen que codifica una proteína mutante. Tal como se usa en el presente documento con respecto a proteínas, el término "mutante" significa una proteína que no realiza su función fisiológica normal o habitual. Pueden producirse mutantes polipeptídicos de *S. aureus* por sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos. Las sustituciones, deleciones o adiciones pueden implicar uno o más restos. Especialmente preferidas entre estas son las sustituciones, adiciones y deleciones que alteran las propiedades y actividades de una proteína de *S. aureus* de la presente invención.

Las expresiones "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los siguientes ejemplos son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento génico, loci (locus) definido a partir del análisis de ligamiento, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si están presentes, las modificaciones a la estructura de nucleótidos pueden impartirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse con componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje. La expresión polinucleótido "recombinante" significa un polinucleótido de origen genómico, de ADNc, semisintético o sintético que, o bien no existe en la naturaleza, o está unido a otro polinucleótido en una disposición no natural. Un "oligonucleótido" se refiere a un polinucleótido monocatenario que tiene menos de aproximadamente 100 nucleótidos, menos que aproximadamente, por ejemplo, 75, 50, 25 o 10 nucleótidos.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" (si es monocatenario) se usan indistintamente en este documento para referirse a polímeros de aminoácidos. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no-aminoácidos. Los términos también incluyen un polímero de aminoácido que se ha modificado; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación, tal como conjugación con un componente de marcaje. Tal como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales.

o sintéticos, que incluyen glicina y ambos isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "operón *sirABC*" se refiere a un grupo de genes bacterianos que comprende *sirA*, *sirB* y *sirC* que comparten un promotor común. Se ha descubierto que este operón es importante para el crecimiento restringido en hierro de *S. aureus*. Ejemplos de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del operón *sirABC* pueden encontrarse en el número de acceso a GenBank AY251022 y en el número de acceso a GenBank AF079518. *SirA* se identificó previamente como una lipoproteína (Heinrichs et al., (1999) J. Bacteriol. 181: 1436-1443) y su expresión está estrictamente controlada por la actividad de la proteína Fur en *S. aureus*. *SirB* y *SirC* codifican los dominios transmembrana de un transportador ABC. En particular, la mutación de *sirA* o *sirB* aumenta la resistencia de *S. aureus* a la estreptonigrina y da como resultado un crecimiento comprometido en medios restringidos en hierro. Dichos mutantes también están comprometidos en la capacidad de reconocer y transportar el sideróforo estafilobactina en la célula. Los términos "*SirA*", "*SirB*" y "*SirC*" incluyen fragmentos o porciones de los mismos y fragmentos o porciones de los mismos biológicamente activos.

La expresión "sistema de transporte de sideróforo de hierro *SirABC*" se refiere al transportador *SirABC* que está compuesto por los polipéptidos *SirA*, *SirB*, *SirC* y *FhuC*.

Las expresiones "proteína *Sir*" o "polipéptido *Sir*" se refieren a las proteínas *SirA*, *SirB* y/o *SirC*. Las expresiones "nucleótido *sir*", "ácido nucleico *sir*" o "gen *sir*" se refieren a los ácidos nucleicos *sirA*, *sirB* y/o *sirC*.

La expresión "cepa deficiente en *Sir*" se refiere a una cepa bacteriana que no expresa al menos una proteína *Sir*. La expresión "cepa deficiente en *FhuC*" se refiere a una cepa bacteriana que no expresa *FhuC*.

El término "estafilobactina" se refiere al sideróforo de hierro que es transportado a la célula por el sistema de transporte de sideróforo de hierro *SirABC*.

La expresión "molécula pequeña" se refiere a un compuesto que tiene un peso molecular menor de aproximadamente 5 kD, menor de aproximadamente 2,5 kD, menor de aproximadamente 1,5 kD, o menor de aproximadamente 0,9 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, ácidos péptidonucleicos, peptidomiméticos, hidratos de carbono, lípidos u otras moléculas orgánicas (que contienen carbono) o inorgánicas. Muchas compañías farmacéuticas tienen grandes librerías de mezclas químicas y/o biológicas, a menudo extractos fúngicos, bacterianos o de algas, que pueden evaluarse con cualquiera de los ensayos de la invención. La expresión "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula pequeña que a menudo se identifica como un compuesto orgánico o medicinal, y no incluye moléculas que sean exclusivamente ácidos nucleicos, péptidos o polipéptidos.

La expresión "sustancialmente homólogo" cuando se usa en relación con secuencias de aminoácidos, se refiere a secuencias que son sustancialmente idénticas o similares en secuencia entre sí, dando lugar a una homología de conformación y, por lo tanto, a la conservación, de forma útil, de una o más actividades biológicas (incluso inmunológicas). El término no pretende implicar una evolución común de las secuencias.

Un "sujeto" se refiere a un mamífero de género masculino o femenino, incluidos los seres humanos.

Un "vector" es una molécula de ácido nucleico autorreplicante que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada en células hospedadoras y/o entre células hospedadoras. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de una molécula de ácido nucleico en una célula, la replicación de vectores que funcionan principalmente para la replicación de ácido nucleico y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se incluyen los vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriores. Tal como se usa en el presente documento, los "vectores de expresión" se definen como polinucleótidos que, cuando se introducen en una célula hospedadora apropiada, se pueden transcribir y traducir en uno o más polipéptidos. Un "sistema de expresión" normalmente connota una célula hospedadora adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

3. Ácidos nucleicos *sirA*, *sirB*, *sirC* y *fhuC*.

La presente divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos, *SirA*, *SirB*, *SirC* y *FhuC* de *S. aureus*, su complemento completo, o sus mutantes. Las Figuras 6-11 muestran las secuencias de ácidos nucleicos que codifican *SirA*, *SirB*, *SirC* y *FhuC* y su complemento completo.

Los ácidos nucleicos también pueden comprender, consistir o consistir esencialmente de cualquiera de las secuencias de nucleótidos *Sir* o *FhuC* o su complemento, como se describe en este documento. También otros ácidos nucleicos comprenden, consisten o consisten esencialmente de una secuencia de nucleótidos que tiene al menos aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad u homología con un gen *Sir* o *FhuC* o su complemento descrito en el presente documento. Utilizando condiciones de hibridación astringentes pueden identificarse secuencias que sean sustancialmente homólogas.

Ácidos nucleicos aislados que difieren de los ácidos nucleicos de la divulgación debido a la degeneración del código genético, también se encuentran dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos se designan por más de un triplete. Los codones que especifican el mismo aminoácido, o sinónimos (por ejemplo, CAU y CAC son sinónimos de histidina) pueden dar lugar a mutaciones "silenciosas" que no afectan a la secuencia de aminoácidos de la proteína. Sin embargo, se espera que existan polimorfismos de secuencia de ADN que conduzcan a cambios en las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de la divulgación. Un experto en la materia apreciará que estas variaciones en uno o más nucleótidos (desde menos de 1% de los nucleótidos hasta aproximadamente 3 o 5% o posiblemente más) de los ácidos nucleicos que codifican una proteína en particular de la divulgación, pueden existir en una especie determinada debido a la variación alélica natural. Cualquiera y todas las variaciones de nucleótidos y polimorfismos de aminoácidos resultantes están dentro del alcance de esta divulgación.

Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican proteínas que tienen secuencias de aminoácidos evolutivamente relacionadas con un polipéptido desvelado en la presente memoria, en el que "evolutivamente relacionadas con" se refiere a proteínas que tienen diferentes secuencias de aminoácidos que han surgido de manera natural (por ejemplo, por varianza alélica o por empalme diferencial), así como variantes mutacionales de las proteínas de la divulgación que se obtienen, por ejemplo, por mutagénesis combinatoria.

También se proporcionan fragmentos de los polinucleótidos de la divulgación, que codifican una porción biológicamente activa de los polipéptidos en cuestión. Tal como se usa en este documento, un fragmento de un ácido nucleico que codifica una porción activa de un polipéptido descrito en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos que tiene menos nucleótidos que la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de longitud completa de un polipéptido de la divulgación, y que codifica un polipéptido determinado que conserva al menos una porción de actividad biológica de la proteína Sir o FhuC de longitud completa tal como se define en el presente documento, o como alternativa, que es funcional como un modulador de la actividad biológica de la proteína de longitud completa. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen un polipéptido que contiene un dominio de la proteína de longitud completa a partir de la cual se obtiene el polipéptido que media la interacción de la proteína con otra molécula (por ejemplo, polipéptido, ADN, ARN, etc.).

Los ácidos nucleicos proporcionados en este documento también pueden contener secuencias enlazadoras, sitios de endonucleasa de restricción modificada y otras secuencias útiles para la clonación molecular, expresión o purificación de dichos polipéptidos recombinantes.

Un ácido nucleico que codifica un polipéptido Sir o FhuC proporcionado en el presente documento puede obtenerse a partir de ARNm o ADN genómico de cualquier organismo de acuerdo con los protocolos descritos en la presente memoria, así como los generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Un ADNc que codifica un polipéptido de la divulgación, por ejemplo, se puede obtener aislando ARNm total de un organismo, por ejemplo, una bacteria, virus, mamífero, etc. Después, se pueden preparar ADNc bicatenarios a partir del ARNm total, y posteriormente insertarse en un vector plasmídico o en un vector bacteriófago adecuado utilizando cualquiera de las técnicas conocidas. Un gen que codifica un polipéptido de la divulgación también puede clonarse utilizando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa establecidas de acuerdo con la información de la secuencia de nucleótidos proporcionada en la divulgación. Los métodos para la amplificación de un ácido nucleico de la divulgación, o de un fragmento del mismo, pueden comprender: (a) proporcionar un par de oligonucleótidos monocatenarios, cada uno de los cuales tiene al menos ocho nucleótidos de longitud, complementarios a las secuencias de un ácido nucleico de la divulgación, y en el que las secuencias a las que los oligonucleótidos son complementarios están separadas por al menos diez nucleótidos; y (b) poner en contacto los oligonucleótidos con una muestra que comprende un ácido nucleico que comprende el ácido nucleico de la divulgación en condiciones que permiten la amplificación de la región situada entre el par de oligonucleótidos, amplificando así el ácido nucleico.

La presente divulgación también incluye vectores recombinantes, que incluyen los ácidos nucleicos aislados de sir o fhuC, y a las células hospedadoras que contienen los vectores recombinantes, así como a los métodos de fabricación de tales vectores y células hospedadoras y para usarlos para la producción de polipéptidos de *S. aureus* por técnicas recombinantes.

Utilizando técnicas bien conocidas, tales como infección, transducción, transfección, transvección, electroporación y transformación, pueden introducirse vectores apropiados en células hospedadoras. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, plasmídico, vírico o retrovírico. Los vectores retrovíricos pueden ser competentes o defectuosos en cuanto a su replicación. En el último caso, la propagación vírica generalmente ocurrirá solo en células hospedadoras complementarias.

El vector puede contener un marcador de selección para la propagación en un hospedador. Generalmente, se introduce un vector plasmídico en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, éste puede empaquetarse *in vitro* utilizando una línea celular de empaquetamiento apropiada y después transducirse en las células hospedadoras.

Vectores preferidos comprenden regiones de control que actúan en cis con respecto al polinucleótido de interés. Factores de transducción apropiados que actúan en trans, pueden ser suministrados por el hospedador,

suministrados por un vector complementario o suministrados por el propio vector tras su introducción en el hospedador.

Los vectores pueden proporcionar expresión específica, que puede ser inducible y/o específica del tipo de célula. Particularmente preferidos entre dichos vectores se encuentran aquellos que son inducibles por factores ambientales que son fáciles de manipular, tales como la temperatura y los aditivos nutrientes.

Los vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores que proceden de cromosomas, episomas y virus, por ejemplo, vectores procedentes de plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episomas de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus tales como baculovirus, papovavirus, virusvaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores procedentes de combinaciones de los mismos, tales como cósmidos y fagémidos.

El inserto de ADN debe estar unido operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp y tac de *E. coli*, los promotores tempranos y tardíos de SV40 y los promotores de LTR (*long terminal repeats*, repeticiones terminales largas) retrovíricas, por nombrar algunos. Los expertos en la técnica conocerán otros promotores adecuados. Las construcciones de expresión contendrán adicionalmente sitios para el inicio y terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos maduros expresados por las construcciones incluirá preferiblemente un sitio de inicio de la traducción al comienzo y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) apropiadamente ubicado en el extremo del polipéptido a traducir.

Tal como se indica, los vectores de expresión incluirán preferiblemente al menos un marcador de selección. Dichos marcadores incluyen dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para cultivos de células eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen, pero sin limitación, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura; células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y Sf9; células animales tales como CHO, COS y células de melanoma Bowes; y células vegetales. En la técnica se conocen medios y condiciones de cultivo apropiados para las células hospedadoras descritas anteriormente.

Entre los vectores preferidos para uso en bacterias se incluyen pQE70, pQE60 y pQE9, pQE10 disponible en Qiagen; vectores pBS, vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A disponibles en Stratagene; la serie pET de vectores disponibles en Novagen; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles en Pharmacia. Entre los vectores eucariotas preferidos están pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI y pSG disponibles en Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles en Pharmacia. Otros vectores adecuados serán fácilmente obvios para los expertos en la técnica.

Entre los promotores bacterianos conocidos adecuados para uso en la presente invención se incluyen los promotores lacI y lacZ de *E. coli*, los promotores T3, T5 y T7, el promotor gpt, los promotores lambda PR y PL, el promotor trp y el promotor quimérico xyl/tet. Promotores eucariotas adecuados incluyen el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de timidina quinasa de HSV, los promotores temprano y tardío de SV40, los promotores de LTR retrovíricas, tales como los del virus del sarcoma de Rous (RSV) y promotores de metalotioneína, tales como el promotor de metalotioneína-I de ratón.

La introducción de la construcción en la célula hospedadora puede efectuarse por transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar (por ejemplo, Davis, et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986)).

La transcripción de ADN que codifica los polipéptidos de la presente divulgación mediante eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 nucleótidos que actúan para aumentar la actividad transcripcional de un promotor en un tipo determinado de célula hospedadora. Ejemplos de potenciadores incluyen el potenciador de SV40, que se localiza en el lado tardío del origen de replicación en los nucleótidos 100 a 270, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus.

Para la secreción del polipéptido traducido en el lumen del retículo endoplasmático, en el espacio periplasmático o en el entorno extracelular, pueden incorporarse señales de secreción apropiadas en el polipéptido expresado, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos KDEL. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas. Como alternativa, como se demuestra en el Ejemplo 3, *sirA* que carece de un péptido señal puede clonarse en un vector de expresión de *E. coli* para producir grandes cantidades de SirA soluble.

Las secuencias codificantes para un polipéptido de interés se pueden incorporar como parte de un gen de fusión que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido diferente. La presente divulgación contempla un

ácido nucleico aislado que comprende un ácido nucleico de la divulgación y al menos una secuencia heteróloga que codifica un péptido heterólogo unido en el marco a la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de la divulgación para codificar una proteína de fusión que comprende el polipéptido heterólogo. El polipéptido heterólogo puede estar fusionado con (a) el extremo C del polipéptido codificado por el ácido nucleico de la divulgación, (b) el extremo N del polipéptido, o (c) el extremo C y el extremo N del polipéptido. En determinados casos, la secuencia heteróloga codifica un polipéptido que permite la detección, aislamiento, solubilización y/o estabilización del polipéptido al que está fusionado. La secuencia heteróloga puede codificar un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una etiqueta de poliHis, myc, HA, GST, proteína A, proteína G, péptido de unión a calmodulina, tioredoxina, proteína de unión a maltosa, poliarginina, poli His-Asp, FLAG, una porción de una proteína de inmunoglobulina y un péptido de transcitosis.

Sistemas de expresión de fusión pueden ser útiles cuando es deseable producir un fragmento inmunogénico de un polipéptido de la divulgación. Por ejemplo, la proteína de la cápside VP6 de rotavirus puede utilizarse como una proteína transportadora inmunológica para porciones de polipéptido, en forma monomérica o en forma de una partícula de virus. Las secuencias de ácido nucleico correspondientes a la porción de un polipéptido de la divulgación contra la cual deben producirse los anticuerpos, pueden incorporarse en una construcción génica de fusión que incluye secuencias codificantes para una proteína estructural de virus vaccinia tardío para producir un conjunto de virus recombinantes que expresan proteínas de fusión que comprenden una porción de la proteína como parte del virión. El antígeno de superficie de la hepatitis B también se puede utilizar con esta función. De forma similar, pueden crearse construcciones quiméricas que codifican proteínas de fusión que contienen una porción de un polipéptido de la divulgación y la proteína de la cápside de poliovirus para potenciar la inmunogenicidad (véase, por ejemplo, la publicación EP NO: 0259149 y Evans et al, (1989) Nature 339: 385; Huang et al., (1988) J. Virol. 62: 3855; y Schlienger et al., (1992) J. Virol. 66: 2).

Las proteínas de fusión pueden facilitar la expresión y/o purificación de proteínas. Por ejemplo, un polipéptido de la divulgación se puede generar como una proteína de fusión glutatión-S-transferasa (GST). Dichas proteínas de fusión GST pueden utilizarse para simplificar la purificación de un polipéptido de la divulgación, tal como utilizando matrices derivatizadas con glutatión (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., (NY: John Wiley & Sons, 1991)). En otra realización, un gen de fusión que codifica una secuencia líder de purificación, tal como una secuencia de sitio de escisión de poli-(His)/enteroquinasa en el extremo N de la porción deseada de la proteína recombinante, puede permitir la purificación de la proteína de fusión expresada mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina metálica de Ni²⁺. La secuencia líder de purificación puede después eliminarse posteriormente mediante tratamiento con enteroquinasa para proporcionar la proteína purificada (por ejemplo, véase Hochuli et al., (1987) J. Chromatography 411: 177, y Janknecht et al., PNAS USA 88: 8972).

Técnicas para producir genes de fusión son bien conocidas. Esencialmente, la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias polipeptídicas se realiza de acuerdo con técnicas convencionales, empleando extremos con acabado romo o escalonado para el ligamiento, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según corresponda, tratamiento con fosfatasa alcalina para impedir uniones no deseadas y ligamiento enzimático. El gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automáticos. Como alternativa, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que pueden emparejarse posteriormente para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992).

Los ácidos nucleicos de la divulgación se pueden inmovilizar sobre una superficie sólida, incluyendo, placas, placas de microtitulación, portaobjetos, perlas, partículas, esferas, películas, hebras, precipitados, geles, láminas, tubos, recipientes, capilares, almohadillas, portaobjetos, etc. Los ácidos nucleicos de la divulgación se pueden inmovilizar en un chip como parte de una matriz. La matriz puede comprender uno o más polinucleótidos descritos en el presente documento. En una realización, el chip comprende uno o más polinucleótidos de la divulgación como parte de una matriz de secuencias de polinucleótidos.

En el presente documento también se desvela el uso de ácidos nucleicos de la divulgación en "terapia antisentido". Como se usa en el presente documento, la terapia antisentido se refiere a la administración o generación *in situ* de sondas de oligonucleótidos o sus derivados que hibridan específicamente, o se unen de otro modo, en condiciones celulares con el ARNm celular y/o ADN genómico que codifica uno de los polipéptidos de la divulgación para inhibir la expresión de ese polipéptido, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o la traducción. La unión puede ser por complementariedad de pares de bases convencional, o, por ejemplo, en el caso de unión al dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco principal de la doble hélice. En general, la terapia antisentido se refiere a la gama de técnicas generalmente empleadas en la técnica, e incluye cualquier terapia que se base en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

El oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente de transporte de un agente de reticulación desencadenado por hibridación, un agente de escisión desencadenado por hibridación, etc. Una molécula antisentido puede ser un "ácido péptidonucleico" (APN). Un APN se refiere a una molécula antisentido

o agente antigénico que comprende un oligonucleótido de al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud unido a un esqueleto peptídico de restos de aminoácidos que terminan en lisina. La lisina terminal confiere solubilidad a la composición. Los APN se unen preferentemente a ADN o ARN monocatenario complementario y detienen la elongación de la transcripción, y pueden pegarse para prolongar su vida útil en la célula.

Una construcción antisentido de la presente divulgación se puede administrar, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario a al menos una porción única del ARNm que codifica un polipéptido de la divulgación. Como alternativa, la construcción antisentido puede ser una sonda de oligonucleótido que se genera *ex vivo* y que, cuando se introduce en la célula, provoca la inhibición de la expresión mediante hibridación con el ARNm y / o las secuencias genómicas que codifican un polipéptido de la divulgación. Dichas sondas de oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos modificados que son resistentes a nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y por lo tanto son estables *in vivo*. Ejemplos de moléculas de ácido nucleico para su uso como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosforamidoato, fosfotioato y metilfosfonato (véanse también las patentes de Estados Unidos 5.176.996, 5.264.564 y 5.256.775). Adicionalmente, por ejemplo, van der Krol et al., (1988) *Biotechniques* 6: 958-976 y Stein et al., (1988) *Cancer Res* 48: 2659-2668, han revisado estrategias generales para construir oligómeros útiles en terapia antisentido.

Se describen ARNs de interferencia pequeños (siRNA) monocatenarios y métodos para administrarlos. Los siRNA disminuyen o bloquean la expresión génica. Si bien no se desea quedar ligado por la teoría, generalmente se piensa que los siRNA inhiben la expresión génica mediante la degradación del ARNm específico de la secuencia. La interferencia por ARN (iARN) es el proceso de silenciamiento génico postranscripcional, específico de la secuencia, particularmente en animales y plantas, iniciado por ARN bicatenario (ARNbc) que es homólogo en secuencia al gen silenciado (Elbashir et al., *Nature* 2001; 411 (6836): 494-8). De acuerdo con esto, se entiende que los siRNA y los ARNbc largos que tienen una identidad de secuencia sustancial con toda o con una porción de un polinucleótido de la presente divulgación, se pueden utilizar para inhibir la expresión de un ácido nucleico de la divulgación.

Como alternativa, los siRNA que disminuyen o bloquean la expresión de los polipéptidos Sir o FhuC descritos en este documento pueden determinarse ensayando una pluralidad de construcciones de siRNA frente al gen diana. Dichos siRNA frente a un gen diana pueden sintetizarse químicamente. Las secuencias de nucleótidos de las cadenas de ARN individuales se seleccionan de modo que la cadena tenga una región de complementariedad con el gen diana que se va a inhibir (es decir, la cadena de ARN complementaria comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región de un transcrito de ARNm que se forma durante la expresión del gen diana, o sus productos de procesamiento, o una región de un virus de cadena (+)). La etapa de sintetizar la cadena de ARN puede implicar una síntesis en fase sólida, donde los nucleótidos individuales se unen de extremo a extremo a través de la formación de enlaces fosfodiéster 3'-5' internucleotídicos en ciclos de síntesis consecutivos.

En el presente documento se proporcionan moléculas de siRNA que comprenden una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en una secuencia de un ácido nucleico de Sir o FhuC tal como se describen en este documento. Una molécula de siRNA puede comprender dos cadenas, comprendiendo cada cadena una secuencia de nucleótidos que es al menos esencialmente complementaria entre sí, una de las cuales corresponde esencialmente a una secuencia de un gen diana. La secuencia que corresponde esencialmente a una secuencia de un gen diana se denomina "secuencia diana sentido" y la secuencia que es esencialmente complementaria a la misma se denomina "secuencia diana antisentido" del siRNA. Las secuencias diana sentido y antisentido pueden tener una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos consecutivos; de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos consecutivos; de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos consecutivos o una longitud de aproximadamente 19, 20, 21, 22 o 23 nucleótidos. La longitud de las secuencias sentido y antisentido se determina de modo que un siRNA que tenga secuencias diana sentido y antisentido de esa longitud, sea capaz de inhibir la expresión de un gen diana, preferiblemente sin inducir de manera significativa una respuesta de interferón del hospedador.

Las secuencias diana de siRNA pueden predecirse utilizando cualquiera de los algoritmos disponibles en internet de mmcmmanus con la extensión web.mit.edu/mmcmmanus/www/home 1.2files /siRNAs.

La secuencia diana sentido puede ser esencial o sustancialmente idéntica a la porción codificante o no codificante, o una combinación de las mismas, de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, la secuencia diana sentido puede ser esencialmente complementaria a la región 5' o 3' no traducida, promotor, intrón o exón de un ácido nucleico diana o su complemento. También puede ser esencialmente complementaria a una región que incluye el límite entre dos de dichas regiones génicas.

La composición de bases de nucleótidos de la secuencia diana sentido puede ser aproximadamente 50% de adeninas (As) y timidinas (Ts) y 50% de citidinas (Cs) y guanosinas (Gs). Como alternativa, la composición de bases puede ser al menos 50% de Cs/Gs, por ejemplo, aproximadamente 60%, 70% u 80% de Cs/Gs. En consecuencia, la elección de la secuencia diana sentido puede basarse en la composición de bases de nucleótidos. Con respecto a la accesibilidad de los ácidos nucleicos diana por los siRNA, se puede determinar, por ejemplo, tal como se describe en Lee et al. (2002) *Nature Biotech.* 19: 500. Esta estrategia implica el uso de oligonucleótidos que son

complementarios a los ácidos nucleicos diana como sondas para determinar la accesibilidad del sustrato, por ejemplo, en extractos celulares. Después de formar un dúplex con la sonda de oligonucleótidos, el sustrato se vuelve susceptible a RNasa H. Por lo tanto, el grado de sensibilidad de la RNasa H a una sonda dada como se determina, por ejemplo, mediante PCR, refleja la accesibilidad del sitio elegido, y puede tener un valor predictivo de cuán bien

funcionaría un siRNA correspondiente para inhibir la transcripción de este gen diana. También se pueden usar algoritmos que identifiquen cebadores para ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o para identificar oligonucleótidos antisentido para identificar primeras secuencias diana.

De manera preferente, las secuencias diana sentido y antisentido son suficientemente complementarias, de modo que un siRNA que comprende ambas secuencias es capaz de inhibir la expresión del gen diana, es decir, de mediar la interferencia por ARN. Por ejemplo, las secuencias pueden ser suficientemente complementarias para permitir la hibridación en las condiciones deseadas, por ejemplo, en una célula. Por consiguiente, las secuencias diana sentido y antisentido pueden ser al menos aproximadamente 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idénticas y pueden diferir, por ejemplo, a lo sumo en 5, 4, 3, 2, 1 o 0 nucleótidos.

Las secuencias diana sentido y antisentido también son preferiblemente secuencias que no es probable que interaccionen significativamente con secuencias distintas del ácido nucleico diana o del complemento del mismo. Esto puede confirmarse, por ejemplo, comparando la secuencia elegida con las otras secuencias en el genoma de la célula diana. Las comparaciones de secuencias se pueden realizar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando el algoritmo BLAST, descrito adicionalmente en este documento. Por supuesto, también se pueden realizar experimentos a pequeña escala para confirmar que una primera secuencia diana particular es capaz de inhibir específicamente la expresión de un ácido nucleico diana y esencialmente no la de otros genes.

Los siRNA también pueden comprender secuencias además de las secuencias sentido y antisentido. Por ejemplo, un siRNA puede ser un dúplex de ARN que consiste en dos cadenas de ARN, en el que al menos una cadena tiene un saliente en el extremo 3'. La otra cadena puede tener un extremo romo o tener un saliente. En la realización en la que la molécula de ARN es bicatenaria (doble cadena) y ambas cadenas comprenden un saliente, la longitud de los salientes puede ser igual o diferente en cada cadena. En una realización particular, un siRNA comprende secuencias sentido y antisentido, cada una de las cuales está en una cadena de ARN, que consta de aproximadamente 19-25 nucleótidos que están emparejados y que tienen salientes de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, en particular, aproximadamente 2, nucleótidos en ambos extremos 3' del ARN. Con el fin de potenciar aún más la estabilidad del ARN de la presente descripción, los salientes en 3' se pueden estabilizar contra la degradación. En una realización, el ARN se estabiliza incluyendo nucleótidos de purina, tales como nucleótidos de adenosina o guanosina. Como alternativa, la sustitución de nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, por ejemplo, la sustitución de 2 nucleótidos de uridina en salientes del extremo 3' por 2'-desoxitimidina se tolera y no afecta a la eficacia de la interferencia por ARN (iARN). La ausencia de un 2' hidroxilo también puede potenciar significativamente la resistencia a la nucleasa del saliente al menos en el medio de cultivo tisular. Las cadenas de ARN de los siRNA pueden tener un grupo 5' fosfato y uno 3' hidroxilo.

En una realización, una molécula de siRNA comprende dos cadenas de ARN que forman un dúplex. En otra realización, una molécula de siRNA consta de una cadena de ARN que forma un bucle en horquilla, donde las secuencias diana sentido y antisentido se hibridan y la secuencia entre las dos secuencias diana es una secuencia espaciadora que forma esencialmente el bucle de la estructura en horquilla. La secuencia espaciadora puede ser cualquier combinación de nucleótidos y tener cualquier longitud siempre que dos oligonucleótidos complementarios unidos por un espaciador que tenga esta secuencia puedan formar una estructura en horquilla, en la que al menos parte del espaciador forma el bucle en el extremo cerrado de la horquilla. Por ejemplo, la secuencia espaciadora puede tener una longitud de aproximadamente 3 a aproximadamente 30 nucleótidos; de aproximadamente 3 a aproximadamente 20 nucleótidos; de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 nucleótidos; de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 nucleótidos; o de aproximadamente 3 a aproximadamente 9 nucleótidos. La secuencia puede ser cualquier secuencia, siempre que no interfiera con la formación de una estructura en horquilla. En particular, la secuencia espaciadora no es preferiblemente una secuencia que tenga ninguna homología significativa con la primera o la segunda secuencia diana, ya que esto podría interferir con la formación de una estructura en horquilla. La secuencia espaciadora tampoco es preferiblemente similar a otras secuencias, por ejemplo, secuencias genómicas de la célula en la que se introducirá el ácido nucleico, ya que esto puede dar como resultado efectos no deseados en la célula.

Un experto en la técnica entenderá que cuando se hace referencia a un ácido nucleico, por ejemplo, un ARN, el ARN puede comprender o consistir en nucleótidos naturales o derivados de nucleótidos que proporcionan, por ejemplo, más estabilidad al ácido nucleico. Se permite cualquier derivado siempre que el ácido nucleico sea capaz de funcionar de la manera deseada. Por ejemplo, un siRNA puede comprender derivados nucleotídicos siempre que el siRNA sea aún capaz de inhibir la expresión del gen diana.

Por ejemplo, los siRNA pueden incluir una o más bases modificadas y/o una cadena principal modificada para la estabilidad o por otras razones. Por ejemplo, los enlaces fosfodiéster del ARN natural pueden modificarse para incluir al menos uno de un heteroátomo de nitrógeno o azufre. Por otro lado, en la invención puede utilizarse siRNA

que comprenda bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar solo dos ejemplos. Se apreciará que se han realizado una gran variedad de modificaciones al ARN que sirven para muchos propósitos útiles que son conocidos por los expertos en la técnica. El término siRNA, tal como se emplea en el presente documento, abarca dichas formas de siRNA modificadas química, enzimática o metabólicamente, siempre que proceda de un molde endógeno.

No hay limitación en la manera en que se puede sintetizar un siRNA. Por lo tanto, puede sintetizarse *in vitro* o *in vivo*, utilizando procedimientos manuales y/o automáticos. La síntesis *in vitro* puede ser química o enzimática, por ejemplo, utilizando ARN polimerasa clonada (por ejemplo, T3, T7, SP6) para la transcripción de un molde de ADN (o ADNc), o una mezcla de ambas. Los siRNA también pueden prepararse sintetizando cada una de las dos cadenas, por ejemplo, químicamente, e hibridando las dos cadenas para formar un dúplex. *In vivo*, el siRNA puede sintetizarse utilizando técnicas recombinantes muy conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989); DNA Cloning, volúmenes I y II (D. N. Glover). ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (MJ Gait ed, 1984); Nucleic Acid Hybridization (BD Hames & SJ Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R. I. Freshney ed. 1986); Immobilised Cells and Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the series, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds. 1987, Cold Spring Harbor Laboratory), Methods in Enzymology Vol. 154 y Vol. 155 (Wu y Grossman, y Wu, eds., respectivamente), Mayer y Walker, eds. (1987), Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, Londres), Scopes, (1987), Protein Purification: Principles and Practice, Segunda Edición (Springer-Verlag, N.Y.) y Handbook of Experimental Immunology, volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell eds 1986). Por ejemplo, las células bacterianas se pueden transformar con un vector de expresión que comprenda el molde de ADN del cual se obtendrá el siRNA.

Si se sintetiza fuera de la célula, el siRNA puede purificarse antes de la introducción en la célula. La purificación puede ser mediante extracción con un disolvente (tal como fenol/cloroformo) o resina, precipitación (por ejemplo, en etanol), electroforesis, cromatografía o una combinación de las mismas. Sin embargo, la purificación puede dar como resultado la pérdida de siRNA y, por lo tanto, puede ser mínima o no llevarse a cabo. El siRNA puede secarse para su conservación o disolverse en una solución acuosa, que puede contener tampones o sales para promover el emparejamiento y/o la estabilización de las cadenas de ARN.

La estructura bicatenaria puede estar formada por una sola cadena de ARN autocomplementaria o por dos cadenas de ARN complementarias distintas.

Se sabe que las células de mamífero pueden responder a siRNA extracelular y, por lo tanto, pueden tener un mecanismo de transporte para el ARNbc (Asher et al. (1969) Nature 223 715-717). De este modo, el siRNA puede administrarse extracelularmente en una cavidad, espacio intersticial, en la circulación de un mamífero o introducirse por vía oral. Los métodos para la introducción oral incluyen la mezcla directa del ARN con el alimento del mamífero, así como las estrategias diseñadas en las que una especie que sirve como alimento se modifica por ingeniería genética para expresar el ARN, y después se alimenta al mamífero para que se vea afectado. Por ejemplo, bacterias alimentarias, tales como *Lactococcus lactis*, pueden transformarse para producir el ARNbc (véanse los documentos WO93/17117, WO97/14806). La circulación vascular o extravascular, la sangre o los sistemas linfáticos y el líquido cefalorraquídeo son lugares donde se puede inyectar el ARN.

El ARN puede introducirse en la célula intracelularmente. A este respecto, también pueden utilizarse métodos físicos de introducción de ácidos nucleicos. El siRNA se puede administrar utilizando las técnicas de microinyección descritas en Zernicka-Goetz et al. (1997) Development 124, 1133 - 1137 y en Wianny et al. (1998) Chromosoma 107, 430 - 439.

Otros métodos físicos de introducción intracelular de ácidos nucleicos incluyen el bombardeo con partículas cubiertas por siRNA, por ejemplo, tecnología de pistola génica en la que el siRNA está inmovilizado sobre partículas de oro y se dispara directamente en el lugar de la herida. Por lo tanto, la invención proporciona el uso de un siRNA en una pistola génica para inhibir la expresión de un gen diana. Además, se proporciona una composición adecuada para terapia con pistola génica que comprende un siRNA y partículas de oro. Un método físico alternativo incluye la electroporación de membranas celulares en presencia del siRNA. Este método permite siARN a gran escala. Se pueden utilizar otros métodos conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos en células, tales como transporte de vehículo mediado por lípidos, transporte mediado por productos químicos, tal como fosfato de calcio y similares. El siRNA se puede introducir junto con componentes que realizan una o más de las siguientes actividades: potenciar la captación de ARN por la célula, promover el emparejamiento de las cadenas dúplex, estabilizar las cadenas emparejadas o, de otro modo, aumentar la inhibición del gen diana.

Para administrar el ARN se puede utilizar cualquier técnica conocida de terapia génica. Una construcción de virus empaquetada en una partícula de virus lograría tanto la introducción eficaz de una construcción de expresión en la célula como la transcripción de siRNA codificado por la construcción de expresión. Por lo tanto, también se puede producir siRNA dentro de una célula. Para esa finalidad pueden utilizarse vectores, por ejemplo, vectores de expresión que comprenden un ácido nucleico que codifica una o las dos cadenas de una molécula de siRNA. El ácido nucleico puede comprender además una secuencia antisentido que es esencialmente complementaria a la

secuencia diana sentido. El ácido nucleico puede comprender además una secuencia espaciadora entre la secuencia diana sentido y antisentido. El ácido nucleico puede comprender además un promotor para dirigir la expresión de las secuencias sentido y antisentido en una célula, por ejemplo, un promotor de ARN polimerasa II o III y una señal de terminación transcripcional. Las secuencias pueden estar unidas operativamente.

5 En una realización, un ácido nucleico comprende una región codificante de ARN (por ejemplo, secuencia diana sentido o antisentido) unida operativamente a un promotor de ARN polimerasa III. La región codificante de ARN puede estar seguida inmediatamente por una secuencia de terminación de pol III, que dirige la terminación de la síntesis de ARN por pol III. Las secuencias terminadoras de pol III generalmente tienen 4 o más restos de timidina ("T") consecutivos. En una realización preferida, como terminador, se utiliza un grupo de 5 restos de T consecutivos mediante el cual se detiene la transcripción pol III en la segunda o tercera T del molde de ADN, y así solo se añaden de 2 a 3 restos de uridina ("U") al extremo 3' de la secuencia codificante. Se puede utilizar una variedad de promotores pol III con la invención, incluyendo, por ejemplo, los fragmentos del promotor procedentes de genes de ARN H1 o genes de snARN U6 de origen humano o de ratón o de cualquier otra especie. Además, los promotores pol III pueden modificarse/diseñarse genéticamente para incorporar otras propiedades deseables tales como la capacidad de ser inducidos por moléculas químicas pequeñas, ya sea de manera general o de una manera específica en un tejido. Por ejemplo, en una realización, el promotor puede activarse con tetraciclina. En otra realización, el promotor puede activarse con IPTG (sistema lacI).

20 Los siRNA pueden producirse en células transformando células con dos ácidos nucleicos, por ejemplo, vectores, comprendiendo cada ácido nucleico un casete de expresión, comprendiendo cada casete de expresión un promotor, una secuencia codificante de ARN (siendo una de ellas, una secuencia diana sentido y la otra una secuencia diana antisentido) y una señal de terminación. Como alternativa, un solo ácido nucleico puede comprender estos dos casetes de expresión. En otra realización más, un ácido nucleico codifica un ARN monocatenario que comprende una secuencia diana sentido ligada a un espaciador ligado a una secuencia diana antisentido. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en un vector, tal como un vector de expresión, por ejemplo, un vector de expresión eucariota que permite la expresión de las secuencias diana sentido y antisentido en las células en las que se introduce.

30 Por ejemplo, en Paul et al. (2002) Nature Biotechnology 29: 505; Xia et al. (2002) Nature Biotechnology 20: 1006; Zeng et al. (2002) Mol. Cell 9: 1327; Thijn et al. (2002) Science 296: 550; BMC Biotechnol. 28 de agosto de 2002; 2 (1): 15; Lee et al. (2002) Nature Biotechnology 19: 500; McManus et al. (2002) RNA 8: 842; Miyagishi et al. (2002) Nature Biotechnology 19: 497; Sui et al. (2002) PNAS 99: 5515; Yu et al. (2002) PNAS 99: 6047; Shi et al. (2003) Tendencias Genet. 19 (1): 9; Gaudilliere et al. (2002) J. Biol. Chem. 277 (48): 46442; y en los documentos US2002/0182223, US2003/0027783, WO 01/36646 y WO 03/006477, se describen vectores para producir siRNA. V vectores también están disponibles comercialmente. Por ejemplo, el vector pSilencer está disponible en Gene Therapy Systems, Inc. y el sistema pSUPER RNAi está disponible en Oligoengine.

40 En el presente documento también se proporcionan composiciones que comprenden uno o más siRNA o ácido nucleico que codifica una región codificante de ARN de un siRNA. Las composiciones pueden ser composiciones farmacéuticas y comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también se pueden proporcionar en un dispositivo para administrar la composición en una célula o en un sujeto. Por ejemplo, una composición puede estar presente en una jeringa o en un estent. Una composición también puede comprender agentes que facilitan la entrada del siRNA o ácido nucleico en una célula.

45 En general, los oligonucleótidos pueden sintetizarse utilizando protocolos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Caruthers et al., Methods in Enzymology (1992) 211: 3-19; Thompson et al., Publicación PCT Internacional No. WO 99/54459; Wincott et al., Nucl. Acids Res. (1995) 23: 2677 - 2684; Wincott et al., Methods Mol Bio., (1997) 74:59; Brennan et al., Biotechnol. Bioeng. (1998) 61: 33 - 45 y Brennan, Patente de Estados Unidos No. 6.001.311.

50 En general, la síntesis de oligonucleótidos implica grupos convencionales de protección y acoplamiento de ácidos nucleicos, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5', y fosforamiditas en el extremo 3'. En un ejemplo no limitante, se realizan síntesis a pequeña escala en un sintetizador de ARN Expedite 8909 comercializado por Applied Biosystems, Inc. (Weiterstadt, Alemania), utilizando ribonucleósidos fosforamiditas comercializados por ChemGenes Corporation (Ashland Technology Center, 200 Homer Avenue, Ashland, MA 01721, Estados Unidos). Como alternativa, las síntesis pueden realizarse en un sintetizador de placa de 96 pocillos, tal como el instrumento producido por Protogene (Palo Alto, CA, EE. UU.), o mediante métodos tales como los descritos en Usman et al., J. Am. Chem. Soc. (1987) 109: 7845; Scaringe et al., Nucl. Acids Res. (1990) 18: 5433; Wincott et al., Nucl. Acids Res. (1990) 23: 2677 - 2684 y Wincott et al., Methods Mol. Bio. (1997) 74:59.

60 Las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación se pueden sintetizar por separado y los ARNbc se pueden formar post-sintéticamente, por ejemplo, mediante ligamiento (Moore et al., Science (1992) 256: 9923; Draper et al., Publicación PCT Internacional No. WO 93 / 23569; Shabarova et al., Nucl Acids Res. (1991) 19: 4247; Bellon et al., Nucleosides & Nucleotides (1997) 16: 951 y Bellon et al., Bioconjugate Chetn. (1997) 8: 204; o por hibridación después de la síntesis y/o desprotección. Las moléculas de ácido nucleico se pueden purificar mediante electroforesis en gel utilizando métodos convencionales o se pueden purificar por cromatografía líquida de alta

presión (HPLC; véase Wincott et al., citado anteriormente, cuya totalidad se incorpora en el presente documento como referencia) y resuspenderse en agua.

En otra realización, el nivel de un ARNm o de un polipéptido en particular en una célula se reduce introduciendo en la célula una ribozima o un ácido nucleico que la codifica. Las moléculas de ribozima diseñadas para escindir catalíticamente transcritos de ARNm también se pueden introducir en células, o expresar en células, para inhibir la expresión del gen Y (véase, por ejemplo, Sarver et al., 1990, Science 247: 1222-1225 y la patente de Estados Unidos N° 5.093.246). Un motivo de ribozima habitualmente utilizado es la ribozima de cabeza de martillo, para el cual los requisitos de secuencia del sustrato son mínimos. El diseño de la ribozima de cabeza de martillo se describe en Usman et al., Current Opin. Struct. Biol. (1996) (5): 527 - 533). Usman también describe los usos terapéuticos de las ribozimas. Las ribozimas también pueden prepararse y utilizarse tal como se describe en Long et al., FASEB J. (1993) 7:25; Symons, Ann. Rev. Biochem. (1992) 61: 641; Perrotta et al., Biochem. (1992) 37: 16-17; Ojwang et al., Proc. Natl. Acad. Set (USA) (1992) 89: 10802 - 10808; y en la Patente de Estados Unidos N° 5.254.678. La escisión por ribozima del ARN del VIH-I se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5.144.019; los métodos para escindir ARN utilizando ribozimas se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.116.742; y los métodos para aumentar la especificidad de las ribozimas se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.225.337 y en Koizumi et al., Nucleic Acid Res. (1989) 77: 7059 - 7071. La preparación y uso de fragmentos de ribozima en una estructura de cabeza de martillo también se describe en Koizumi et al., Nucleic Acids Res. (1989) 77: 7059 - 7071. La preparación y uso de fragmentos de ribozima en una estructura en horquilla se describe en Chowrira y Burke, Nucleic Acids Res. (1992) 20: 2835. Las ribozimas también pueden prepararse mediante transcripción rodante tal como se describe en Daubendiek y Kool, Nat. Biotechnol. (1997) 15 (3). : 273-277.

La expresión génica puede reducirse al dirigirse a secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen diana (es decir, el promotor del gen y / o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que impiden la transcripción del gen en células diana en el organismo. (Véase, en líneas generales, Helene (1991) Anticancer Drug Des., 6 (6): 569 - 84; Helene et al. (1992) Ann. NY. Acad. ScL, 660: 27 - 36 y Maher (1992) Bioassays 14 (12): 807-15).

En una realización adicional, pueden introducirse o expresarse en una célula aptámeros de ARN. Los aptámeros de ARN son ligandos de ARN específicos para proteínas, tales como el ARN Tat y Rev (Good et al. (1997) Gene Therapy 4: 45-54) que pueden inhibir específicamente su traducción.

4. Polipéptidos Sir A, SirB, SirC y FhuC

Los polipéptidos SirA, SirB, SirC y FhuC descritos en el presente documento incluyen productos purificados de manera natural, productos de procedimientos sintéticos químicos y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de una célula hospedadora procariota o eucariota, que incluye, por ejemplo, células de bacterias, levaduras, plantas superiores, insectos y mamíferos. En ciertas realizaciones, los polipéptidos descritos en el presente documento inhiben la función de los polipéptidos Sir y FhuC.

Los polipéptidos también pueden comprender, consistir en o consistir esencialmente en una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos tal como se muestra en las Figuras 6-11. Ejemplos de secuencias polipeptídicas para SirA, SirB, SirC y FhuC se muestran en las Figuras 7-9 y 11, respectivamente. Además, otros polipéptidos comprenden, consisten en o consisten esencialmente en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad u homología con los polipéptidos Sir o FhuC descritos en este documento. Por ejemplo, también se contemplan polipéptidos que difieren de una secuencia en una proteína de origen natural en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos. Las diferencias pueden ser sustituciones, por ejemplo, sustituciones, deleciones o adiciones conservativas. Las diferencias están preferiblemente en regiones que no están significativamente conservadas entre diferentes especies. Dichas regiones se pueden identificar alineando las secuencias de aminoácidos de varias especies. Estos aminoácidos pueden sustituirse, por ejemplo, con los encontrados en otra especie. Otros aminoácidos que pueden sustituirse, insertarse o deleccionarse en estas u otras ubicaciones pueden identificarse mediante estudios de mutagénesis acoplados con ensayos biológicos.

Otras proteínas que se incluyen en el presente documento son las que comprenden aminoácidos modificados. Son ejemplos de proteínas las proteínas derivadas que pueden ser modificadas por glicosilación, pegilación, fosforilación o por cualquier proceso similar, que conserva al menos una función biológica de la proteína de la cual deriva.

Las proteínas también pueden comprender uno o más aminoácidos no naturales. Por ejemplo, aminoácidos no clásicos o análogos químicos de aminoácidos se pueden introducir como una sustitución o adición en proteínas. Aminoácidos no clásicos incluyen, pero no se limitan a, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido alfa-amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, gamma-Abu, épsilon-Ahx, ácido 6-amino hexanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, beta-alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos de diseño tales como beta-metil-aminoácidos, Calfa-metil-aminoácidos, Nalfa-metil-aminoácidos y análogos de aminoácidos en general. Además, el

aminoácido puede ser D (dextrógiro) o L (levógiro).

En ciertas realizaciones, un polipéptido Sir o FhuC descrito en el presente documento puede ser una proteína de fusión que contiene un dominio que aumenta su solubilidad y / o facilita su purificación, identificación, detección y / o caracterización estructural. Los ejemplos de dominios incluyen, por ejemplo, glutatión S-transferasa (GST), proteína A, proteína G, péptido de unión a calmodulina, tiorredoxina, proteína de unión a maltosa, HA, myc, poli arginina, poli His, poli His-Asp o proteínas de fusión y etiquetas FLAG. Otros ejemplos de dominios incluyen dominios que alteran la localización de proteínas *in vivo*, tales como péptidos señal, péptidos dirigidos al sistema de secreción de tipo III, dominios transcritosis, señales de localización nuclear, etc. En diversas realizaciones, un polipéptido de la divulgación puede comprender una o más fusiones heterólogas. Los polipéptidos pueden contener múltiples copias del mismo dominio de fusión o pueden contener fusiones en dos o más dominios diferentes. Las fusiones pueden producirse en el extremo N del polipéptido, en el extremo C del polipéptido, o en ambos extremos N y C del polipéptido. También está dentro del alcance de la invención incluir secuencias enlazadoras entre un polipéptido de la divulgación y el dominio de fusión para facilitar la construcción de la proteína de fusión o para optimizar la expresión de proteínas o las limitaciones estructurales de la proteína de fusión. En otra realización, el polipéptido se puede construir de modo que contenga sitios de escisión de proteasa entre el polipéptido de fusión y el polipéptido de la divulgación para eliminar la etiqueta después de la expresión de la proteína o posteriormente. Ejemplos de endoproteasas adecuadas incluyen, por ejemplo, proteasas del Factor Xa y del TEV (*Tobacco Etch Virus*, virus del grabado del tabaco).

Los polipéptidos de *S. aureus* pueden recuperarse y purificarse de cultivos celulares recombinantes mediante métodos muy conocidos, entre los que se incluyen precipitación con sulfato de amonio o con etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxipatito, cromatografía de lectina y para la purificación se emplea cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC"). Las proteínas pueden utilizarse como una preparación sustancialmente pura, por ejemplo, en la que en la preparación, al menos aproximadamente el 90% de la proteína es la proteína deseada. También se pueden utilizar composiciones que comprenden al menos aproximadamente 50%, 60%, 70% u 80% de la proteína deseada.

Los polipéptidos de la divulgación pueden sintetizarse por medios químicos, con ribosomas en un sistema acelular, o con ribosomas dentro de una célula. La síntesis química de los polipéptidos de la divulgación se puede llevar a cabo utilizando una variedad de métodos reconocidos en la técnica, que incluyen síntesis gradual en fase sólida, semisíntesis a través de religamiento conformacionalmente asistido de fragmentos peptídicos, ligamiento enzimático de segmentos peptídicos clonados o sintéticos, y ligamiento químico. El ligamiento químico nativo emplea una reacción quimioselectiva de dos segmentos peptídicos desprotegidos para producir un producto intermedio transitorio unido por un tioéster. El producto intermedio transitorio unido por un tioéster sufre después un reordenamiento para proporcionar el producto de ligamiento de longitud completa que tiene un enlace peptídico nativo en el sitio de ligamiento. Los productos de ligación de longitud completa son químicamente idénticos a las proteínas producidas por síntesis libre de células. Los productos de ligamiento de longitud completa pueden replegarse y/u oxidarse, según se permita, para formar moléculas proteicas nativas que contienen enlaces disulfuro (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 6.184.344 y 6.174.530; y Muir et al., Curr. Opin. Biotech. (1993): vol. 4, pág. 420; Miller et al., Science (1989): volumen 246, pág. 1149; Wlodawer et al., Science (1989): volumen 245, pág. 616; Huang et al., Biochemistry (1991): vol. 30, pág. 7402; Schnolzer, et al, Int. J. Pept. Prot. Res. (1992): volumen 40, pág. 180-193; Rajarathnam et al., Science (1994): volumen 264, pág. 90; RE Offord, "Approaches to Protein Engineering", en Desing and the Development of Nwe therapeutics and Vaccines, J. B. Hook, G. Poste, Eds., (Plenum Press, Nueva York, 1990) págs. 253-282; Wallace et al. J. Biol. Chem. (1992): vol. 267, pág. 3852; Abrahmsen et al., Biochemistry (1991): vol. 30, pág. 4151; Chang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA (1994) 91: 12544 - 12548; Schnlzer et al., Science (1992): vol., 3256, pág 221; y Akaji et al., Chem. Pharm. Toro. (Tokio) (1985) 33: 184).

Puede ser ventajoso proporcionar homólogos de origen natural o derivados experimentalmente de un polipéptido de la divulgación. Dichos homólogos pueden funcionar con capacidad limitada como un modulador para promover o inhibir un subconjunto de las actividades biológicas de la forma natural del polipéptido. Por lo tanto, se pueden provocar efectos biológicos específicos mediante tratamiento con un homólogo de función limitada, y con menos efectos secundarios en relación con el tratamiento con agonistas o antagonistas que se dirigen a todas las actividades biológicas de un polipéptido de la divulgación. Por ejemplo, pueden generarse homólogos antagonistas que interfieran con la capacidad del polipéptido de tipo silvestre de la divulgación para asociarse con ciertas proteínas, pero que no interfieran sustancialmente con la formación de complejos entre el polipéptido nativo y otras proteínas celulares.

Los polipéptidos pueden proceder de los polipéptidos de longitud completa de la divulgación. Las porciones de peptidilo aisladas de esos polipéptidos se pueden obtener mediante exploración de polipéptidos producidos de manera recombinante a partir del fragmento correspondiente del ácido nucleico que codifica dichos polipéptidos. Además, los fragmentos pueden sintetizarse químicamente utilizando técnicas conocidas en la materia, tales como química en fase sólida convencional, f-Moc o t-Boc de Merrifield. Por ejemplo, las proteínas se pueden dividir arbitrariamente en fragmentos de longitud deseada sin superposición de los fragmentos, o se pueden dividir

en fragmentos superpuestos de una longitud deseada. Los fragmentos pueden producirse (de manera recombinante o por síntesis química) y analizarse para identificar aquellos fragmentos de peptidilo que tienen una propiedad deseada, por ejemplo, la capacidad de funcionar como un modulador de los polipéptidos de la divulgación. En una realización ilustrativa, porciones de peptidilo de una proteína de la divulgación pueden analizarse con respecto a la actividad de unión, así como a la capacidad inhibidora, mediante expresión como, por ejemplo, proteínas de fusión de tiorredoxina, cada una de las cuales contiene un fragmento discreto de una proteína de la divulgación (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.270.181 y 5.292.646; y la publicación PCT WO94/02502).

Pueden prepararse polipéptidos truncados. Los polipéptidos truncados tienen de 1 a 20 o más restos de aminoácidos eliminados de uno o ambos extremos N y C. Dichos polipéptidos truncados pueden resultar más susceptibles a la expresión, purificación o caracterización que el polipéptido de longitud completa. Por ejemplo, los polipéptidos truncados pueden resultar más adecuados que el polipéptido de longitud completa para la cristalización, para producir cristales difractantes de alta calidad o para producir un espectro HSQC con picos de alta intensidad y picos mínimamente solapantes. Además, el uso de polipéptidos truncados también puede identificar dominios estables y activos del polipéptido de longitud completa que pueden ser más susceptibles de caracterización.

También es posible modificar la estructura de los polipéptidos de la divulgación con fines tales como potenciar la eficacia o estabilidad terapéutica o profiláctica (por ejemplo, vida útil *ex vivo*, resistencia a la degradación proteolítica *in vivo*, etc.). Dichos polipéptidos modificados, cuando están diseñados para conservar al menos una actividad de la forma natural de la proteína, se consideran "equivalentes funcionales" de los polipéptidos descritos con más detalle en este documento. Dichos polipéptidos modificados se pueden producir, por ejemplo, por sustitución, delección o adición de aminoácidos, cuyas sustituciones pueden consistir total o parcialmente en sustituciones de aminoácidos conservativas.

Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución de aminoácidos conservativa aislada, tal como el reemplazo de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, no tenga un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido da como resultado un homólogo funcional, puede determinarse fácilmente evaluando la capacidad del polipéptido variante para producir una respuesta similar a la de la proteína silvestre. Los polipéptidos en los que ha tenido lugar más de un reemplazo pueden analizarse fácilmente de la misma manera.

Se proporcionan métodos para generar conjuntos de mutantes combinatorios de polipéptidos de la divulgación, así como mutantes de truncamiento, y es especialmente útil para identificar posibles secuencias variantes (por ejemplo, homólogos). El objetivo de la exploración de dichas librerías combinatorias es generar, por ejemplo, homólogos que puedan modular la actividad de un polipéptido de la divulgación, o como alternativa, que posean actividades completamente nuevas. Se pueden generar derivados homólogos obtenidos por combinatoria que tengan una fuerza selectiva con respecto a una proteína de origen natural. Dichos homólogos pueden utilizarse en el desarrollo de productos terapéuticos.

Asimismo, la mutagénesis puede dar lugar a homólogos que tienen semividas intracelulares radicalmente diferentes a las de la proteína de tipo silvestre correspondiente. Por ejemplo, la proteína alterada puede hacerse más estable o menos estable a la degradación proteolítica u otro proceso celular que da como resultado la destrucción o, de otra manera, la inactivación de la proteína. Dichos homólogos, y los genes que los codifican, pueden utilizarse para alterar la expresión de proteínas modulando la semivida de la proteína. Como antes, dichas proteínas se pueden utilizar para el desarrollo de productos terapéuticos o tratamiento.

De manera similar, a través de esta estrategia combinatoria, pueden generarse homólogos de proteínas que actúen como antagonistas, ya que pueden interferir con la actividad de la proteína de tipo silvestre correspondiente.

En un ejemplo representativo de este método, las secuencias de aminoácidos para una población de homólogos de proteínas están alineadas, preferiblemente para promover la homología más alta posible. Dicha población de variantes puede incluir, por ejemplo, homólogos de una o más especies u homólogos de la misma especie, pero que difieren debido a mutación. Los aminoácidos que aparecen en cada posición de las secuencias alineadas se seleccionan para crear un conjunto degenerado de secuencias combinatorias. En ciertas realizaciones, la librería combinatoria puede producirse por medio de una librería degenerada de genes que codifican una librería de polipéptidos, cada uno de los cuales incluye al menos una porción de secuencias de proteínas posibles. Por ejemplo, una mezcla de oligonucleótidos sintéticos puede ligarse enzimáticamente en secuencias génicas de modo que el conjunto degenerado de posibles secuencias de nucleótidos pueda expresarse como polipéptidos individuales, o como alternativa, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para la presentación en fagos).

Hay muchas formas en las que la librería de posibles homólogos puede generarse a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada puede llevarse a cabo en un sintetizador de ADN automático, y los genes sintéticos pueden después ligarse en un vector apropiado para la expresión. Uno de los motivos de obtener un conjunto de genes degenerados es proporcionar, en una mezcla, todas las secuencias que codifican el conjunto deseado de secuencias de proteínas posibles. La síntesis de

oligonucleótidos degenerados es muy conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Narang (1983) *Tetrahedron* 39: 3; Itakura et al. (1981) *Recombinant DNA*, Proc. 3^{er} Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier págs. 273-289; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura et al. (1984) *Science* 198: 1056; Ike y col., (1983) *Nucleic Acid Res.* 11: 477). Dichas técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otras proteínas (véase, por ejemplo, Scott et al., (1990) *Science* 249: 386 - 390, Roberts et al. (1992) *PNAS USA* 89: 2429 - 2433; Devlin et al. (1990) *Science* 249: 404 - 406; Cwirla et al. (1990) *PNAS USA* 87: 6378 - 6382, así como las patentes de Estados Unidos Nos: 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

Como alternativa, se pueden utilizar otras formas de mutagénesis para generar una librería combinatoria. Por ejemplo, los homólogos de proteína (formas tanto agonistas como antagonistas) se pueden generar y aislar de una librería por exploración utilizando, por ejemplo, mutagénesis de barrido con alanina y similares (Ruf et al. (1994) *Biochemistry* 33: 1565-1572; Wang et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 3095 - 3099; Balint et al. (1993) *Gene* 137: 109 - 118; Grodberg et al. (1993) *Eur. J. Biochem.* 218: 597 - 601; Nagashima et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 2888 - 2892; Lowman et al. (1991) *Biochemistry* 30: 10832 - 10838; y Cunningham et al., (1989) *Science* 244: 1081 - 1085), mediante mutagénesis de barrido con enlazador (Gustin et al. (1993) *Virology* 193: 653 - 660; Brown et al. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12: 2644 - 2652; McKnight et al. (1982) *Science* 232: 316); por mutagénesis con saturación (Meyers et al. (1986) *Science* 232: 613); por mutagénesis con PCR (Leung et al. (1989) *Method Cell Mol Biol* 1: 11 - 19); o por mutagénesis aleatoria (Miller et al. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics*, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, y Greener et al. (1994) *Strategies in Mol Biol* 7: 32-34). La mutagénesis de barrido con enlazador, particularmente en un entorno combinatorio, es un método atractivo para identificar formas truncadas de proteínas que son bioactivas.

En la técnica se conoce una amplia gama de técnicas para explorar productos génicos de librerías combinatorias construidas mediante mutaciones puntuales y truncamientos, y para explorar librerías de AñDNc para productos génicos que tienen una propiedad determinada. Dichas técnicas podrán generalmente adaptarse para la exploración rápida de las librerías génicas generadas por la mutagénesis combinatoria de homólogos de proteínas. Las técnicas más ampliamente utilizadas para explorar librerías génicas grandes típicamente comprenden clonar la librería génica en vectores de expresión replicables, transformar células apropiadas con la librería de vectores resultante, y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento relativamente fácil, del vector que codifica el gen cuyo producto fue detectado.

En una realización ilustrativa de un ensayo de exploración, productos génicos combinatorios candidatos se muestran en la superficie de una célula y la capacidad de determinadas células o partículas de virus para unirse al producto génico combinatorio se detecta en un "ensayo de selección". Por ejemplo, la librería génica se puede clonar en el gen para una proteína de membrana de superficie de una célula bacteriana (Ladner et al., documento WO 88/06630; Fuchs et al., (1991) *Bio/Technology* 9: 1370 - 1371; y Goward et al., (1992) *TIBS* 18: 136-140), y la proteína de fusión resultante detectada mediante selección, por ejemplo, utilizando una molécula marcada con fluorescencia que se une a la proteína de la superficie celular, por ejemplo, sustrato FITC, para puntuar para homólogos posiblemente funcionales. Las células pueden examinarse visualmente y separarse con un microscopio de fluorescencia o, cuando la morfología de la célula lo permita, separarse con un clasificador celular activado por fluorescencia. Este método se puede utilizar para identificar sustratos u otros polipéptidos que puedan interactuar con un polipéptido de la divulgación.

De manera similar, la genoteca se puede expresar como una proteína de fusión en la superficie de una partícula de virus. Por ejemplo, en el sistema de fagos filamentosos, las secuencias de péptidos extraños se pueden expresar en la superficie del fago infeccioso, confiriendo de ese modo dos beneficios. En primer lugar, debido a que estos fagos se pueden aplicar a matrices de afinidad a concentraciones muy altas, se puede explorar una gran cantidad de fagos a la vez. En segundo lugar, debido a que cada fago infeccioso muestra el producto genético combinatorio en su superficie, si un fago particular se recupera de una matriz de afinidad con bajo rendimiento, el fago puede amplificarse mediante otra ronda de infección. El grupo de fagos filamentosos de *E. coli*, M13, fd y fl, casi idénticos, se utiliza con mayor frecuencia en las librerías de presentación de fagos, ya que puede utilizarse cualquiera de las proteínas de envoltura gIII o gVIII del fago para generar proteínas de fusión sin alterar el empaquetamiento final de la partícula de virus (Ladner et al., publicación PCT WO 90/02909; Garrard et al., publicación PCT WO 92/09690; Marks et al, (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 16007 - 16010; Griffiths et al., (1993) *EMBO J.* 12: 725. -734; Clackson et al, (1991) *Nature* 352: 624-628, y Barbas et al, (1992) *PNAS USA* 89: 4457-4461). Según sea apropiado, pueden utilizarse otras proteínas de envoltura de fago.

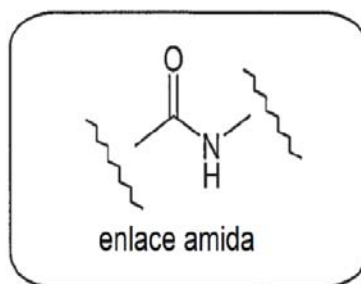
Los polipéptidos descritos en este documento pueden reducirse para generar miméticos, por ejemplo, agentes peptídicos o no peptídicos, que son capaces de imitar la unión de la proteína auténtica con otro compañero celular. Tales técnicas mutagénicas como las descritas anteriormente, así como el sistema de tiorredoxina, son también particularmente útiles para mapear los determinantes de una proteína que participan en una interacción proteína-proteína con otra proteína. Para ilustrar, los restos críticos de una proteína que están implicados en el reconocimiento molecular de una proteína sustrato pueden determinarse y utilizarse para generar peptidomiméticos que pueden unirse a la proteína sustrato. El peptidomimético se puede utilizar entonces como un inhibidor de la proteína de tipo silvestre uniéndose al sustrato y cubriendo los restos críticos necesarios para la interacción con la proteína de tipo silvestre, impidiendo así la interacción de la proteína y el sustrato. Empleando, por ejemplo,

mutagénesis de barrido para mapear los restos de aminoácidos de una proteína que están implicados en la unión a un polipéptido de sustrato, se pueden generar compuestos peptidomiméticos que imitan a esos restos en la unión al sustrato.

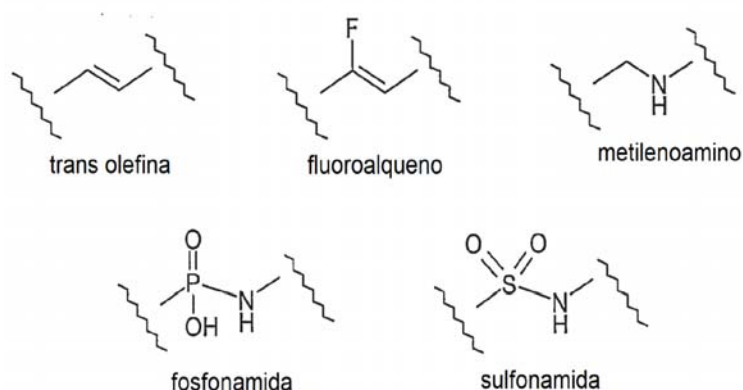
- 5 Por ejemplo, los derivados de las proteínas Sir y la proteína FhuC descritos en este documento pueden ser péptidos y peptidomiméticos químicamente modificados. Los peptidomiméticos son compuestos basados en, o derivados de, péptidos y proteínas. Los peptidomiméticos se pueden obtener por modificación estructural de secuencias peptídicas conocidas utilizando aminoácidos no naturales, restricciones conformacionales, reemplazo isostérico y similares. Los
- 10 peptidomiméticos en cuestión constituyen el continuo del espacio estructural entre los péptidos y las estructuras sintéticas no peptídicas; los peptidomiméticos pueden ser útiles, por lo tanto, para diseñar farmacóforos y para ayudar a traducir los péptidos en compuestos no peptídicos con la actividad de los péptidos precursores.

- Además, pueden proporcionarse mimetopos de los péptidos en cuestión. Dichos peptidomiméticos pueden tener atributos tales como no ser hidrolizables (por ejemplo, mayor estabilidad contra proteasas u otras condiciones
- 15 fisiológicas que degradan el péptido correspondiente), aumento de la especificidad y/o potencia para estimular la diferenciación celular. Con fines ilustrativos, pueden generarse análogos peptídicos no hidrolizables de dichos restos utilizando benzodiazepina (véase, por ejemplo, Freidinger et al., En Peptides: Chemistry and Biology, GR Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Países Bajos, 1988), azepina (véase, por ejemplo, Huffman et al., en Peptides: Chemistry and Biology, GR Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Países Bajos, 1988), anillos de gamma lactama
- 20 sustituidos (Garvey et al, en Peptides: Chemistry and Biology, GR Marshall ed., ESCOM Editor: Leiden, Países Bajos, 1988), pseudopéptidos de cetometileno (Ewenson et al, (1986) J. Med. Chem. 29: 295; y Ewenson et al, en Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9^o American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985), núcleos de dipéptidos de giro β (Nagai et al., (1985) Tetrahedron Lett 26: 647; y Sato et al., (1986) J Chem Soc Perkin Trans 1: 1231), y β -aminoalcoholes (Gordon et al., (1985) Biochem Biophys Res Commun 126: 419; y Dann et al., (1986) Biochem Biophys Res Commun 134: 71).
- 25

- Además de una variedad de reemplazos de cadenas laterales que pueden llevarse a cabo para generar peptidomiméticos, la descripción contempla específicamente el uso de miméticos de estructura secundaria de péptidos restringidos conformacionalmente. Se han desarrollado numerosos sustitutos para el enlace amida de
- 30 péptidos. Los sustitutos frecuentemente aprovechados para el enlace amida incluyen los siguientes grupos (i) trans-olefinas, (ii) fluoroalqueno, (iii) metilenoamino, (iv) fosfonamidas y (v) sulfonamidas.

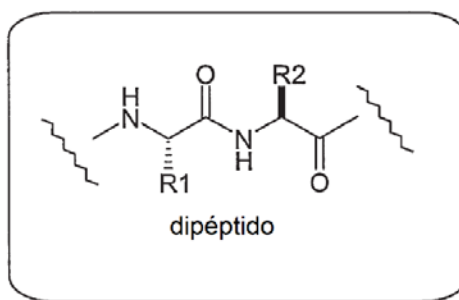


Ejemplos de sustitutos:

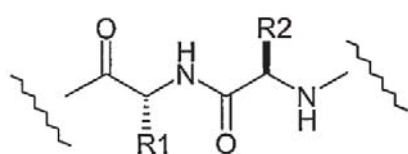


35

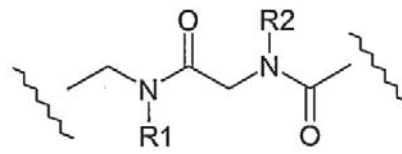
Adicionalmente, se pueden utilizar peptidomiméticos basados en modificaciones más sustanciales de la cadena principal de un péptido. Los peptidomiméticos que se incluyen en esta categoría incluyen (i) análogos retroinversos, y (ii) análogos de N-alquil glicina (denominados peptoides).



Ejemplos de análogos:

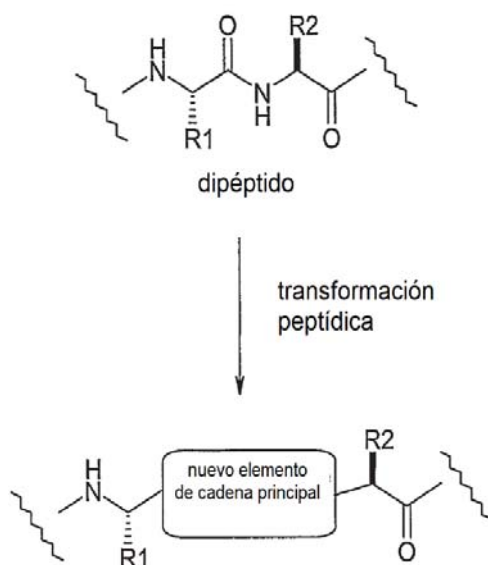


retroinverso



N-alkil glicina

- 5 Además, los métodos de química combinatoria se están aplicando en el desarrollo de nuevos peptidomiméticos. Por ejemplo, una realización de una estrategia denominada "transformación peptídica" se centra en la generación aleatoria de una librería de análogos peptídicos que comprende una amplia gama de sustitutos de enlaces peptídicos.



10

En una realización ilustrativa, el peptidomimético puede obtenerse como un análogo retroinverso del péptido. Dichos análogos retroinversos pueden construirse según los métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos por Sisto et al., patente de Estados Unidos 4.522.752. Se puede generar un análogo retroinverso como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/01720. Se entenderá que puede generarse un péptido mixto, por ejemplo, que incluya algunos enlaces peptídicos normales. Como guía general, los sitios que son más susceptibles a la proteólisis están típicamente alterados, siendo opcionales para la conmutación mimética los enlaces de amida menos susceptibles. El producto final, o intermedios del mismo, se pueden purificar por HPLC.

15

Los péptidos pueden comprender al menos un aminoácido o cualquier aminoácido que sea un estereoisómero D. Otros péptidos pueden comprender al menos un aminoácido que está invertido. El aminoácido que está invertido puede ser un estereoisómero D. Cualquier aminoácido de un péptido puede invertirse y/o cualquier aminoácido puede ser un estereoisómero D.

20

En otra realización ilustrativa, se puede obtener un peptidomimético como un análogo retro enantio de un

25

péptido. Los análogos retro enantio tales como este pueden sintetizarse con D-aminoácidos (o análogos de los mismos) comercialmente disponibles y con técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida o en solución estándar, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 00/01720. El producto final puede purificarse por HPLC para producir el análogo retro enantio puro.

En otra realización ilustrativa, pueden prepararse derivados de trans-olefinas para el péptido en cuestión. Los análogos de trans-olefina pueden sintetizarse según el método de Y.K. Shue et al. (1987) *Tetrahedron Letters* 28: 3225 y como se describe en el documento WO 00/01720. Es posible además acoplar pseudodipéptidos sintetizados mediante el método anterior con otros pseudodipéptidos, para crear análogos peptídicos con varias funcionalidades olefinicas en lugar de funcionalidades amida.

Otra clase más de derivados peptidomiméticos incluye los derivados de fosfonato. La síntesis de dichos derivados de fosfonato se puede adaptar a partir de esquemas de síntesis conocidos. Véase, por ejemplo, Loots et al., en *Peptides: Chemistry and Biology*, (Escom Science Publishers, Leiden, 1988, pág. 118); Petrillo et al., en *Peptides: Structure and Function* (Proceedings of the 9^o American Peptide Symposium, Pierce Chemical Co. Rockland, IL, 1985).

En la técnica se conocen muchas otras estructuras peptidomiméticas y pueden adaptarse fácilmente para su uso en los peptidomiméticos en cuestión. Para ilustrar, un peptidomimético puede incorporar el sustituto 1-azabicyclo [4.3.0] nonano (véase Kim et al., (1997) *J. Org. Chem.* 62: 2847), o un ácido N-acil piperácico (véase Xi et al. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* 120: 80), o un residuo de piperazina 2-sustituido como un análogo de aminoácido restringido (véase Williams et al. (1996) *J. Med. Chem.* 39: 1345-1348). Incluso en otras realizaciones, determinados restos de aminoácidos pueden reemplazarse por residuos de arilo y bi-arilo, por ejemplo, un núcleo aromático o heteroaromático monocíclico o bicíclico, o un núcleo biaromático, aromático-heteroaromático o bi-heteroaromático.

Los peptidomiméticos en cuestión pueden optimizarse, por ejemplo, mediante técnicas de síntesis combinatorias combinadas con exploración de alto rendimiento.

Además, otros ejemplos de mimétopos (epítomos miméticos) incluyen, pero sin limitación, compuestos basados en proteínas, compuestos basados en hidratos de carbono, compuestos basados en lípidos, compuestos basados en ácidos nucleicos, compuestos orgánicos naturales, compuestos orgánicos obtenidos sintéticamente, anticuerpos antiidiotípicos y/o anticuerpos catalíticos, o fragmentos de los mismos. Se puede obtener un mimétopo, por ejemplo, explorando librerías de compuestos naturales y sintéticos para detectar compuestos capaces de inhibir la supervivencia celular y/o el crecimiento tumoral. También se puede obtener un mimétopo, por ejemplo, a partir de librerías de compuestos naturales y sintéticos, en particular, librerías químicas o combinatorias (es decir, librerías de compuestos que difieren en secuencia o tamaño, pero que tienen los mismos componentes esenciales). También se puede obtener un mimétopo, por ejemplo, mediante diseño inteligente de fármacos. En un procedimiento de diseño inteligente de fármacos, la estructura tridimensional de un compuesto de la presente divulgación se puede analizar, por ejemplo, con resonancia magnética nuclear (RMN) o cristalografía de rayos X. La estructura tridimensional se puede utilizar después para predecir posibles estructuras mimetópicas, por ejemplo, por modelado informatizado. Las estructuras mimetópicas predecidas pueden producirse, por ejemplo, mediante síntesis química, tecnología de ADN recombinante o aislando un mimétopo de una fuente natural (por ejemplo, plantas, animales, bacterias y hongos).

Los "péptidos, variantes y derivados de los mismos" o "péptidos y análogos de los mismos" se incluyen en "agentes terapéuticos peptídicos" y la intención es incluir cualquiera de los péptidos o formas modificadas de los mismos, por ejemplo, peptidomiméticos, descritos en el presente documento. Los agentes terapéuticos peptídicos preferidos disminuyen la supervivencia celular o aumentan la apoptosis. Por ejemplo, pueden disminuir la supervivencia celular o aumentar la apoptosis con un factor de al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 30 veces o 100 veces, tal como se determina, por ejemplo, en un ensayo descrito en este documento.

La actividad de una proteína Sir o FhuC, de un fragmento o una variante de la misma, puede analizarse utilizando un sustrato o compañero de unión apropiado u otro reactivo adecuado para ensayar la supuesta actividad, tal como se describe más adelante.

En otra realización, la actividad de un polipéptido puede determinarse analizando el nivel de expresión de moléculas de ARN y/o proteína. Los niveles de transcripción se pueden determinar, por ejemplo, utilizando transferencias de Northern, hibridación con una matriz de oligonucleótidos o analizando el nivel de un producto proteico resultante. Los niveles de traducción se pueden determinar, por ejemplo, utilizando transferencia de Western o identificando una señal detectable producida por un producto proteico (por ejemplo, fluorescencia, luminiscencia, actividad enzimática, etc.). Dependiendo de la situación particular, puede ser deseable detectar el nivel de transcripción y/o traducción de un solo gen o de múltiples genes.

Como alternativa, puede ser deseable medir la tasa global de replicación, transcripción y/o traducción de ADN en una célula. En general, esto puede realizarse cultivando la célula en presencia de un metabolito detectable que se incorpora en el ADN, ARN o producto proteico resultante. Por ejemplo, la tasa de síntesis de ADN puede

determinarse cultivando células en presencia de BrdU, que se incorpora en el ADN recién sintetizado. La cantidad de BrdU puede determinarse después con métodos histoquímicos utilizando un anticuerpo dirigido contra BrdU.

En otras realizaciones, los polipéptidos de la divulgación pueden inmovilizarse sobre una superficie sólida, que incluye placas de microtitulación, portaobjetos, perlas, películas, etc. Los polipéptidos de la divulgación se pueden inmovilizar en un "chip" como parte de una matriz. Una matriz, que tiene una pluralidad de localizaciones, puede comprender uno o más polipéptidos de la divulgación en una o más de esas localizaciones. En una realización, la microplaca comprende uno o más polipéptidos de la divulgación como parte de una matriz de secuencias polipeptídicas.

En otras realizaciones, los polipéptidos de la divulgación pueden inmovilizarse sobre una superficie sólida, que incluye, placas, placas de microtitulación, portaobjetos, perlas, partículas, esferas, películas, cadenas, precipitados, geles, láminas, tubos, recipientes, capilares, almohadillas, láminas, etc. Los polipéptidos de la divulgación pueden inmovilizarse en un "chip" como parte de una matriz. Una matriz, que tiene una pluralidad de localizaciones, puede comprender uno o más polipéptidos de la divulgación en una o más de esas localizaciones. En una realización, la microplaca comprende uno o más polipéptidos de la divulgación como parte de una matriz de secuencias polipeptídicas.

5. Anticuerpos y usos de los mismos

Para producir anticuerpos contra los polipéptidos Sir y FhuC descritos en este documento, los animales hospedadores pueden recibir una inyección de polipéptidos Sir o FhuC o de péptidos Sir o FhuC. Los hospedadores pueden recibir una inyección de péptidos de diferentes longitudes que comprenden una secuencia diana deseada. Por ejemplo, pueden utilizarse antígenos peptídicos que tienen al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 o 150 aminoácidos. Como alternativa, si una porción de una proteína define un epítipo, pero es demasiado corta para ser antigénica, puede conjugarse con una molécula transportadora para producir anticuerpos. Algunas moléculas transportadoras adecuadas incluyen hemocianina de lapa californiana, secuencias de Ig, TrpE y albúmina de suero humano o bovino. La conjugación puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica. Uno de dichos métodos es combinar un resto de cisteína de los fragmentos con un resto de cisteína en la molécula transportadora.

Además, también pueden prepararse anticuerpos contra epítipos tridimensionales, es decir, epítipos no lineales, basándose, por ejemplo, en datos cristalográficos de proteínas. Los anticuerpos obtenidos a partir de esa inyección pueden explorarse frente a los antígenos cortos de las proteínas descritas en este documento. Los anticuerpos preparados contra un péptido Sir o FhuC pueden analizarse para determinar la actividad contra ese péptido, así como la proteína Sir o FhuC de longitud completa. Los anticuerpos pueden tener afinidades de al menos aproximadamente 10^{-6}M , 10^{-7}M , 10^{-8}M , 10^{-9}M , 10^{-10}M , 10^{-11}M o 10^{-12}M o más altas hacia el péptido Sir o FhuC y/o la proteína Sir o FhuC de longitud completa descrita en este documento.

Células adecuadas para las secuencias de ADN y células hospedadoras para la expresión y secreción de anticuerpos pueden obtenerse de varias fuentes, incluida la American Type Culture Collection ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas" 5ª edición (1985) Rockville, Md., U.S.A.) Estados Unidos).

Anticuerpos policlonales y monoclonales pueden producirse mediante métodos conocidos en la técnica. Anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante hibridomas preparados utilizando procedimientos conocidos que incluyen el método inmunológico descrito por Kohler y Milstein, Nature 1975; 256: 495 - 7; y Campbell en "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas" en Burdon et al., Eds. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, volumen 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985), así como por el método de ADN recombinante descrito por Huse et al., Science (1989) 246: 1275-81.

En la técnica son bien conocidos métodos de purificación de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY. Los métodos de purificación pueden incluir precipitación con sal (por ejemplo, con sulfato de amonio), cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, en una columna de intercambio catiónico o aniónico funcionando a pH neutro y eluida con gradientes escalonados fuerza iónica creciente), cromatografía de filtración en gel (que incluye HPLC por filtración en gel) y cromatografía en resinas de afinidad, tales como proteína A, proteína G, hidroxipatito y anti anticuerpo. Los anticuerpos también pueden purificarse en columnas de afinidad de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

También se describen equivalentes funcionales de anticuerpos, e incluyen, por ejemplo, anticuerpos quimerizados, humanizados y monocatenarios, así como fragmentos de los mismos. En la solicitud PCT WO 93/21319; solicitud de patente europea N°. 239.400; solicitud PCT WO 89/09622; solicitud de patente europea 388.745 y solicitud de patente europea EP 332,424, se desvelan métodos para producir equivalentes funcionales.

Los equivalentes funcionales incluyen polipéptidos con secuencias de aminoácidos que son sustancialmente las mismas que las de la secuencia de aminoácidos de las regiones variables o hipervariables de los anticuerpos de la

divulgación. En el presente documento, la expresión "sustancialmente las mismas" que las de la secuencia de aminoácidos, se define como una secuencia con una homología de al menos 70%, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, y más preferiblemente al menos 90% con otra secuencia de aminoácidos, determinada por el método de búsqueda FASTA según Pearson y Lipman, Proc Natl Acad Sci USA (1988) 85: 2444-8.

Los anticuerpos quimerizados pueden tener regiones constantes procedentes de forma sustancial o exclusiva de regiones constantes y regiones variables de anticuerpos humanos procedentes de forma sustancial o exclusiva de la secuencia de la región variable de un mamífero distinto de un ser humano. Los anticuerpos humanizados pueden tener regiones constantes y regiones variables distintas de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) procedentes de forma sustancial o exclusiva de las correspondientes regiones de anticuerpos humanos y las CDR procedentes de forma sustancial o exclusiva de un mamífero distinto de un ser humano.

Mamíferos adecuados distintos de un ser humano, pueden incluir cualquier mamífero a partir del cual puedan prepararse anticuerpos monoclonales. Ejemplos adecuados de mamíferos distintos de un ser humano, pueden incluir, por ejemplo, un conejo, una rata, un ratón, un caballo, una cabra o un primate.

Los anticuerpos contra las proteínas Sir y FhuC, como se describe en este documento, pueden prepararse como se describió anteriormente. Los anticuerpos contra las proteínas Sir y FhuC descritos en este documento (anticuerpos completos o fragmentos de anticuerpos) pueden conjugarse con un material biocompatible, tal como moléculas de polietilenglicol (PEG) de acuerdo con métodos bien conocidos por expertos en la técnica, para aumentar la semivida del anticuerpo. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 6.468.532. Los polímeros funcionalizados con PEG están disponibles, por ejemplo, en Nektar Therapeutics. Los derivados de PEG disponibles comercialmente incluyen, pero sin limitación, amino-PEG, ésteres de aminoácidos de PEG, PEG-hidrazida, PEG-tiol, PEG-succinato, PEG carboximetilado, ácido PEG-propiónico, aminoácidos de PEG, succinimidil succinato de PEG, succinimidil propionato de PEG, succinimidil éster de PEG carboximetilado, succinimidil carbonato de PEG, succinimidil ésteres de aminoácidos de PEG, PEG-oxicarbonylimidazol, PEG-nitrofenil carbonato, tresilato de PEG, PEG-glicidil éter, PEG-aldehído, PEG vinilsulfona, PEG-maleimida, PEG-ortopiridil disulfuro, PEG heterofuncionales, derivados de PEG vinilo, silanos de PEG y fosfolidos de PEG. Las condiciones de reacción para el acoplamiento de estos derivados de PEG variarán dependiendo del polipéptido, del grado de PEGilación deseado y del derivado de PEG utilizado. Algunos factores implicados en la elección de derivados de PEG incluyen: el punto de conexión deseado (tales como grupos R de lisina o cisteína), estabilidad hidrolítica y reactividad de los derivados, estabilidad, toxicidad y antigenicidad del enlace, idoneidad para los análisis, etc.

6. Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos contra SirA, SirB, SirC o FhuC de *S. aureus*, ácidos nucleicos antisentido, siRNA y otros antagonistas pueden administrarse por diversos medios, dependiendo de su uso previsto, tal como se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, si dichas composiciones antagonistas de *S. aureus* se van a administrar por vía oral, éstas pueden formularse como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos o jarabes. Como alternativa, las formulaciones de la presente divulgación se pueden administrar por vía parenteral como inyecciones (intravenosa, intramuscular o subcutánea), preparaciones de infusión en gotas o supositorios. Para la aplicación a través de la membrana mucosa oftálmica, las composiciones de la presente divulgación se pueden formular como gotas o pomadas oculares. Estas formulaciones pueden prepararse por medios convencionales y, si se desea, las composiciones se pueden mezclar con cualquier aditivo convencional, tal como un excipiente, un aglutinante, un agente disgregante, un lubricante, un corrector, un agente solubilizante, un auxiliar de suspensión, un agente emulsionante o un agente de recubrimiento.

En las formulaciones de la divulgación, en los agentes formulados, puede haber agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Las composiciones en cuestión pueden ser adecuadas para la administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal, en aerosol y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier método bien conocido en la técnica farmacéutica. La cantidad de composición que se puede combinar con un material transportador para producir una sola dosis varía dependiendo del sujeto que se esté tratando, y del modo particular de administración.

Los métodos para preparar estas formulaciones incluyen la etapa de poner en contacto las composiciones de la presente descripción con el vehículo y, opcionalmente, con uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto de, forma uniforme e íntima, agentes con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si fuera necesario, dando forma al producto.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, píldoras, comprimidos, tabletas (que utilizan una base aromatizada, generalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en

agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (utilizando una base inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica), conteniendo como ingrediente activo cada una de estas formas, una cantidad predeterminada de una composición de la misma en cuestión. Las composiciones de la presente divulgación también se pueden administrar como un bolo, electuario o pasta.

5 En formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), la composición en cuestión se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico, y/o con cualquiera de los siguientes: (1) agentes de relleno o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábica; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, acetil alcohol y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones también pueden comprender agentes tamponantes. Composiciones sólidas similares también pueden emplearse como agentes de relleno en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras utilizando excipientes tales como lactosa o azúcares lácteos, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Un comprimido puede prepararse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos pueden prepararse utilizando un aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), un lubricante, un diluyente inerte, un conservante, un disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa sódica reticulada), un tensioactivo o un agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla de la composición en cuestión, humedecida con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos y otras formas de dosificación sólidas, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden perforarse o prepararse opcionalmente con revestimientos y cubiertas, tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos muy conocidos en la técnica de formulación farmacéutica.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires, farmacéuticamente aceptables. Además de la composición en cuestión, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes habitualmente utilizados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos.

Las suspensiones, además de la composición en cuestión, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Las formulaciones para administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio, que se puede preparar mezclando una composición en cuestión con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorios o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por lo tanto, se fundirá en la cavidad del cuerpo y liberará el agente activo. Las formulaciones que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen dichos vehículos que se conocen en la técnica como apropiados.

Las formas de dosificación para la administración transdérmica de una composición en cuestión incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El componente activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda ser necesario.

Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de la composición en cuestión, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.

Los polvos y pulverizadores pueden contener, además de una composición en cuestión, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los pulverizadores pueden contener adicionalmente propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

Las composiciones de la presente divulgación se pueden administrar como alternativa en aerosol. Esto se logra preparando un aerosol acuoso, una preparación liposómica o partículas sólidas que contienen el compuesto. Se podría utilizar una suspensión no acuosa (por ejemplo, propulsor de fluorocarbono). Se pueden utilizar nebulizadores ultrasónicos porque minimizan la exposición del agente a la cizalladura, lo que puede dar como resultado la degradación de los compuestos contenidos en las composiciones en cuestión.

Normalmente, un aerosol acuoso se prepara formulando una solución o suspensión acuosa de una composición en cuestión, junto con vehículos y estabilizadores convencionales, farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y estabilizadores varían con los requisitos de la composición particular en cuestión, pero típicamente incluyen tensioactivos no iónicos (Tweens, Pluronic o polietilenglicol), proteínas inocuas como albúmina sérica, ésteres de sorbitán, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, tampones, sales, azúcares o alcoholes de azúcar. Los aerosoles generalmente se preparan a partir de soluciones isotónicas.

Las composiciones farmacéuticas de esta divulgación, adecuadas para administración parenteral, comprenden una composición en cuestión en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones, estériles, isotónicas, acuosas o no acuosas, farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, utilizando materiales de revestimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y utilizando tensioactivos.

Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento pueden utilizarse para prevenir o tratar afecciones o enfermedades resultantes de infecciones por *S. aureus* que incluyen, pero sin limitación, furúnculos, forunculosis crónica, impétigo, osteomielitis aguda, neumonía, endocarditis, síndrome de la piel escaldada, síndrome de choque tóxico e intoxicación alimentaria.

7. Ensayos de exploración ilustrativos para inhibidores del sistema de transporte de hierro de *S. aureus* mediado por SirABC

En general, los agentes o compuestos capaces de inhibir la virulencia patógena se identifican a partir de grandes librerías de productos naturales o extractos sintéticos (o semisintéticos) o librerías químicas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Los expertos en el campo del descubrimiento y desarrollo de fármacos comprenderán que la fuente exacta de los agentes (por ejemplo, extractos o compuestos de ensayo) no es crítica para el (los) procedimiento (s) de exploración (s) de la invención. De acuerdo con esto, puede explorarse prácticamente cualquier cantidad de extractos o compuestos químicos utilizando los métodos descritos en el presente documento. Ejemplos de dichos agentes, extractos o compuestos incluyen, pero sin limitación, extractos a base de plantas, hongos, procariotas o animales, caldos de fermentación y compuestos sintéticos, así como la modificación de compuestos existentes. También hay numerosos métodos disponibles para generar síntesis dirigida o aleatoria (p. ej., semisíntesis o síntesis total) de cualquier cantidad de compuestos químicos, incluidos, pero sin limitación, compuestos basados en sacáridos, lípidos, péptidos y ácidos nucleicos. Las librerías de compuestos sintéticos están disponibles comercialmente en Brandon Associates (Merrimack, NH) y Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). Como alternativa, librerías de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están comercialmente disponibles a partir de una serie de fuentes, que incluyen Biotics (Sussex, RU), Xenova (Slough, RU), Harbor Branch Oceanographic Institute (Ft. Pierce, Fla.), y PharmaMar, Estados Unidos (Cambridge, Mass.). Además, se producen librerías naturales y producidas sintéticamente, si se desea, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por métodos de extracción y fraccionamiento convencionales. Por otro lado, si se desea, cualquier librería o compuesto se modifica fácilmente utilizando métodos químicos, físicos o bioquímicos convencionales.

Además, los expertos en la técnica del descubrimiento y desarrollo de fármacos entienden fácilmente que siempre que sea posible deben emplearse métodos de desreplicación (por ejemplo, desreplicación taxonómica, desreplicación biológica y desreplicación química, o cualquier combinación de los mismos) o la eliminación de copias o repeticiones de materiales ya conocidos para su actividad anti patogénica.

Cuando se encuentra que un extracto crudo tiene una actividad contra patógenos o contra virus, o una actividad de unión, es necesario realizar un fraccionamiento adicional del extracto principal positivo para aislar los constituyentes químicos responsables del efecto observado. Por lo tanto, el objetivo del proceso de extracción, fraccionamiento y purificación es la caracterización e identificación cuidadosa de una entidad química dentro del extracto crudo que tenga actividad contra patógenos. Métodos de fraccionamiento y purificación de dichos extractos heterogéneos son conocidos en la técnica. Si se desea, los compuestos que se muestran como agentes útiles para el tratamiento de la

patogenicidad se modifican químicamente de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Posibles inhibidores de SirA, SirB, SirC, estafilobactina o FhuC, pueden incluir moléculas orgánicas, péptidos, peptidomiméticos, polipéptidos, anticuerpos, ARN antisentido y siRNA que se unen a una secuencia de ácido nucleico o polipéptido de la divulgación y de ese modo inhiben su actividad. Posibles antagonistas también incluyen moléculas pequeñas que se unen y ocupan el sitio de unión del polipéptido impidiendo de ese modo la unión a moléculas de unión celular, de modo que se impide la actividad biológica normal. Otros posibles antagonistas incluyen moléculas antisentido.

7.1 Ensayos de interacción

Polipéptidos SirA, SirB, SirC, estafilobactina y FhuC purificados y recombinantes pueden utilizarse para facilitar el desarrollo de ensayos para explorar agentes que modulen la interacción entre SirA, SirB y SirC o entre SirA, SirB, SirC, estafilobactina y/o FhuC. Posibles inhibidores de SirA, SirB, SirC, estafilobactina o FhuC pueden incluir moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos y anticuerpos que se unen a cualquiera de SirA, SirB, SirC, estafilobactina o FhuC y, por lo tanto, inhiben su actividad.

En un ejemplo de ensayo de exploración, se puede generar una mezcla de reacción que incluya al menos una porción biológicamente activa de los polipéptidos SirA, SirB, SirC, estafilobactina o FhuC, agente(s) de interés y una molécula de interacción apropiada. Tal como se usa en el presente documento, la "molécula de interacción apropiada" puede ser SirA, SirB, SirC, estafilobactina o FhuC, dependiendo de qué polipéptido se utilice en el ensayo de exploración. Por ejemplo, cuando se utiliza SirA, una molécula de interacción apropiada puede ser estafilobactina, SirB o SirC. La detección y cuantificación de la interacción de un polipéptido Sir particular con la molécula de interacción apropiada proporciona un medio para determinar la eficacia de un agente para inhibir la interacción, por ejemplo, entre SirA y Sir B. La eficacia del agente puede evaluarse generando curvas de respuesta a la dosis a partir de datos obtenidos, utilizando diversas concentraciones del agente de ensayo. Además, también se puede realizar un ensayo de control para proporcionar una línea de base para establecer comparaciones. En el ensayo de control, la interacción de los polipéptidos SirA, SirB, SirC, estafilobactina o FhuC con la molécula de interacción apropiada se puede cuantificar en ausencia del agente de ensayo.

La interacción entre los polipéptidos SirA, SirB, SirC, estafilobactina o FhuC y la molécula de interacción apropiada se puede detectar mediante diversas técnicas. La inhibición de la formación de complejos puede cuantificarse utilizando, por ejemplo, proteínas marcadas de manera detectable, tales como polipéptidos radiomarcados, marcados con fluorescencia o marcados enzimáticamente, mediante inmunoensayo o mediante detección cromatográfica.

La medición de la interacción de una proteína Sir o FhuC particular con la molécula de interacción apropiada se puede observar directamente utilizando tecnología de resonancia de plasmón superficial en dispositivos biodetectores ópticos. Este método es particularmente útil para medir interacciones con polipéptidos más grandes (> 5 kDa) y se puede adaptar para explorar inhibidores de la interacción entre una proteína y otra.

Como alternativa, será deseable inmovilizar SirA, SirB, SirC, estafilobactina o FhuC o la molécula de interacción apropiada para facilitar la separación de complejos de formas no forman complejadas de una o ambas proteínas, así como para dar cabida a la automatización del ensayo. La unión de SirA a la molécula de interacción, por ejemplo, en presencia y ausencia de un agente candidato, puede realizarse en cualquier recipiente adecuado que contenga los reactivos. Los ejemplos incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En una realización, puede proporcionarse una proteína de fusión que añade un dominio que permite que la proteína se una a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión glutatión-S-transferasa / SirA (GST / SirA) se pueden adsorber en perlas de glutatión-sefara (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o en placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que después se combinan, por ejemplo, con una molécula de interacción marcada con ³⁵S, y el agente de ensayo, y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación del complejo, por ejemplo, en condiciones fisiológicas con respecto a salinidad y pH, aunque pueden desearse condiciones ligeramente más rigurosas. Después de la incubación, las perlas se lavan para eliminar cualquier marcador no unido, y la matriz inmovilizada y el radiomarcador se determinan directamente (por ejemplo, perlas colocadas en centelleante), o en el sobrenadante, después de que los complejos se disocian posteriormente. Como alternativa, los complejos se pueden disociar de la matriz, separados mediante SDS-PAGE, y se cuantifica el nivel de molécula de interacción en la fracción de perlas del gel utilizando técnicas electroforéticas convencionales.

Otras técnicas para inmovilizar proteínas y otras moléculas en matrices también están disponibles para uso en el ensayo en cuestión. Por ejemplo, cualquiera de SirA, SirB, SirC, estafilobactina, FhuC o la molécula de interacción apropiada, pueden inmovilizarse utilizando la conjugación de biotina y estreptavidina. Por ejemplo, se pueden preparar SirA, SirB, SirC, estafilobactina o FhuC biotinilados a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) utilizando técnicas muy conocidas en la materia (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill), e inmovilizarse en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). Como alternativa, anticuerpos reactivos con cualquiera de SirA, SirB, SirC, estafilobactina o FhuC, pero que no interfieran con la interacción entre los polipéptidos y la molécula de interacción, pueden derivatizarse en los pocillos de la placa,

y SirA, SirB, SirC, estafilobactina o FhuC pueden quedar atrapados en los pocillos por conjugación con anticuerpos. Como anteriormente, las preparaciones de una molécula de interacción y un compuesto de ensayo se pueden incubar en los pocillos de la placa que presentan los polipéptidos, y la cantidad de complejo atrapado en el pocillo se puede cuantificar en presencia o ausencia de un agente de ensayo. Métodos ilustrativos para detectar dichos complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen la inmunodetección de complejos que utilizan anticuerpos reactivos con la molécula de interacción o ensayos ligados a enzimas que se basan en la detección de una actividad enzimática asociada con la molécula de interacción.

Por ejemplo, una enzima puede conjugarse químicamente o proporcionarse como una proteína de fusión con la molécula de interacción. Para ilustrar, la molécula de interacción puede reticularse por medios químicos o fusionarse por medios genéticos con peroxidasa de rábano picante, y la cantidad de polipéptido atrapado en el complejo puede evaluarse con un sustrato cromogénico de la enzima, por ejemplo, teraclorhidrato de 3,3'-diamino-benzadina o 4-cloro-1-naftol. Asimismo, se puede proporcionar una proteína de fusión que comprenda el polipéptido y la glutatión-S-transferasa, y la formación del complejo se puede cuantificar detectando la actividad de GST utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (Habig et al. (1974) J. Biol. Chem 249: 7130).

7.2. Ensayos de transporte de hierro

Como alternativa, pueden desarrollarse ensayos de exploración para explorar agentes que modulan la actividad de transporte de hierro de los polipéptidos Sir. Las concentraciones apropiadas de agentes de ensayo para modular la actividad de transporte de hierro de las proteínas Sir pueden determinarse por cualquier método conocido por el experto en la materia.

En una realización, el ensayo de exploración puede incluir células de *S. aureus* completas que expresan polipéptidos SirA, SirB, SirC o FhuC de tipo silvestre. La capacidad de un compuesto para alterar la actividad del transporte de hierro de dichos polipéptidos puede detectarse mediante análisis de las células. Por ejemplo, pueden detectarse antagonistas del transporte de hierro puntuando las alteraciones en el crecimiento o la diferenciación (fenotipo) de la célula en medios repletos de hierro. El crecimiento de cepas de *S. aureus* de tipo silvestre en presencia uno o más agentes de ensayo se puede comparar con el crecimiento de cepas de *S. aureus* deficientes en SirA, SirB o FhuC. Cada cultivo puede tratarse con un agente de ensayo de una librería de compuestos o extractos naturales, y controlarse con respecto al efecto que el agente particular tiene sobre el crecimiento en la cepa de tipo silvestre o en la cepa deficiente en Sir o en la cepa deficiente en FhuC. El crecimiento bacteriano puede controlarse utilizando un medidor Klett. Los compuestos que interfieren específicamente con el sistema de transporte de sideróforo de hierro SirABC, afectarán solo al crecimiento de la cepa de tipo silvestre.

Como alternativa, las células de *S. aureus* pueden cultivarse y tratarse con agentes de ensayo y después explorarse para detectar la presencia de hierro en la célula utilizando técnicas de espectroscopia de absorción atómica (Cox (1994) Meth. Enzymol. 235: 315).

Como alternativa, la inhibición de la actividad de transporte de hierro puede medirse utilizando hierro marcado radioactivamente. Los compuestos que interfieren con el sistema de transporte de sideróforo de hierro SirABC darán como resultado una absorción reducida del hierro marcado radioactivamente. También se puede realizar un ensayo de control para proporcionar una referencia para establecer comparaciones. En el ensayo de control, la absorción de hierro marcado radioactivamente en una célula de *S. aureus* se puede cuantificar en ausencia del compuesto de ensayo. Los ejemplos de hierro marcado radioactivamente pueden incluir ^{59}Fe o ^{55}Fe .

7.3. Ensayos de expresión

En una realización adicional, los antagonistas del sistema de transporte de hierro pueden afectar a la expresión de un ácido nucleico o proteína *sirA*, *sirB*, *sirC* o *fhuC*. En esta exploración, las células de *S. aureus* pueden tratarse con uno o más compuestos de interés, y después ensayarse para determinar el efecto del (de los) compuesto (s) sobre la expresión de un ácido nucleico o proteína *sirA*, *sirB*, *sirC* o *fhuC*.

Por ejemplo, a partir de células de *S. aureus* cultivadas en presencia o ausencia de agentes de ensayo, puede aislarse ARN total, utilizando cualquier técnica adecuada, tal como el método de guanidinio-tiocianato-fenol-cloroformo de una etapa descrito en Chomczynski et al. (1987) Anal. Biochem. 162: 156-159. La expresión de *sirA*, *sirB*, *sirC* o *fhuC* puede por tanto ensayarse mediante cualquier método apropiado, como el análisis de transferencia de Northern, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transcripción inversa en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y transcripción inversa en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR).

El análisis de transferencia de Northern se puede realizar como se describe en Harada et al. (1990) Cell 63: 303-312. En resumen, a partir de células de *S. aureus* cultivadas en presencia de un agente de ensayo se prepara ARN total. Para la transferencia de Northern, el ARN se desnaturaliza en un tampón apropiado (tal como tampón de glioxal / dimetilsulfóxido / fosfato de sodio), se somete a electroforesis en gel de agarosa y se transfiere a un filtro de nitrocelulosa. Después de que los ARN se hayan unido al filtro mediante un enlazador UV, el filtro se prehibrida en

una solución que contiene formamida, SSC, solución de Denhardt, esperma de salmón desnaturalizado, SDS y tampón de fosfato de sodio. Una secuencia de ADN de *sirA*, *sirB*, *sirC* o *fhuC* de *S. aureus* puede marcarse de acuerdo con cualquier método apropiado (tal como el sistema de marcaje de ADN multicebado con ^{32}P (Amersham)) y utilizarse como sonda. Después de la hibridación durante la noche, el filtro se lava y se expone a una película de rayos X. Además, también se puede realizar un control para proporcionar una referencia para establecer comparaciones. En el control, la expresión de *sirA*, *sirB*, *sirC* o *fhuC* en *S. aureus* puede cuantificarse sin agente de ensayo.

Como alternativa, también pueden ensayarse los niveles de ARNm que codifica los polipéptidos *SirA*, *SirB*, *SirC* o *FhuC*, por ejemplo, utilizando el método de RT-PCR descrito en Makino et al. (1990) Technique 2:295-301. En resumen, este método implica añadir ARN total aislado de células de *S. aureus* cultivadas en presencia de un agente de ensayo, en una mezcla de reacción que contiene un cebador de RT y tampón apropiado. Después de incubar para emparejamiento del cebador, la mezcla se puede complementar con un tampón RT, dNTP, DTT, inhibidor de RNasa y transcriptasa inversa. Después de la incubación para lograr la transcripción inversa del ARN, los productos de RT se someten después a PCR utilizando cebadores marcados. Como alternativa, en lugar de marcar los cebadores, se puede incluir un dNTP marcado en la mezcla de reacción de PCR. La amplificación por PCR se puede realizar en un termociclador de ADN de acuerdo con técnicas convencionales. Después de un número adecuado de rondas para lograr la amplificación, la mezcla de reacción de PCR se somete a electroforesis en un gel de poliacrilamida. Después de secar el gel, la radioactividad de las bandas apropiadas puede cuantificarse utilizando un analizador de formación de imágenes. Los ingredientes y condiciones de la reacción RT y PCR, las concentraciones de reactivo y gel, y los métodos de marcaje son muy conocidos en la técnica. Las variaciones en el método de RT-PCR serán obvias para el experto en la técnica. Otros métodos de PCR que pueden detectar el ácido nucleico de la presente divulgación se pueden encontrar en PCR Primer: A Laboratory Manual (Dieffenbach et al. eds., Cold Spring Harbor Lab Press, 1995). También se puede realizar un control para proporcionar una referencia para establecer comparaciones. En el control, la expresión de *sirA*, *sirB* o *sirC* en *S. aureus* puede cuantificarse sin la presencia de agente de ensayo.

Como alternativa, la expresión de los polipéptidos *SirA*, *SirB*, *SirC* o *FhuC* puede cuantificarse siguiendo el tratamiento de células de *S. aureus* con un agente de ensayo utilizando métodos basados en anticuerpos tales como inmunoensayos. Se puede utilizar cualquier inmunoensayo adecuado, incluyendo, pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos utilizando técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos con proteína A.

Por ejemplo, los polipéptidos *SirA*, *SirB*, *SirC* o *FhuC* pueden detectarse en una muestra obtenida de células de *S. aureus* tratadas con un agente de ensayo, mediante un ensayo de tipo sándwich de dos etapas. En la primera etapa, se utiliza un reactivo de captura (por ejemplo, un anticuerpo contra *SirA*, *SirB*, *SirC* o *FhuC*) para capturar el polipéptido específico. El reactivo de captura se puede inmovilizar opcionalmente en una fase sólida. En la segunda etapa, se utiliza un reactivo de detección marcado directa o indirectamente para detectar el marcador capturado. En una realización, el reactivo de detección es un anticuerpo. La cantidad de polipéptido *SirA*, *SirB*, *SirC* o *FhuC* presente en células de *S. aureus* tratadas con un agente de ensayo puede calcularse en referencia a la cantidad presente en células de *S. aureus* no tratadas.

Marcadores enzimáticos adecuados incluyen, por ejemplo, los del grupo oxidasa, que catalizan la producción de peróxido de hidrógeno por reacción con el sustrato. La glucosa oxidasa es particularmente preferida ya que tiene buena estabilidad y su sustrato (glucosa) se encuentra fácilmente disponible. La actividad de un marcador de oxidasa puede analizarse midiendo la concentración de peróxido de hidrógeno formado por la reacción anticuerpo/sustrato marcado con enzima. Además de las enzimas, otros marcadores adecuados incluyen radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H).

Como ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados se incluyen un marcador de fluoresceína, un marcador de isotiocianato, un marcador de rodamina, un marcador de ficoeritrina, un marcador de ficocianina, un marcador de alofocianina, un marcador de o-ftaldehído y un marcador de fluorescamina.

Como ejemplos de marcadores enzimáticos adecuados se incluyen malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, levadura-alcohol deshidrogenasa, alfa-glicerol fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. Como ejemplos de marcadores quimioluminiscentes se incluyen un marcador de luminol, un marcador de isoluminol, un marcador de éster de acridinio aromático, un marcador de imidazol, un marcador de sal de acridinio, un marcador de éster de oxalato, un marcador de luciferina, un marcador de luciferasa y un marcador de aequorina.

Ejemplos

La invención, que se ha descrito en líneas generales, puede entenderse más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen únicamente con fines ilustrativos de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención, y que no pretenden limitar la invención de manera alguna.

Ejemplo 1: Materiales y métodos para los Ejemplos 2-5

Medios y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas, los plásmidos y los oligonucleótidos utilizados en los Ejemplos 2-5 se enumeran en la Tabla 1. Para la clonación y la expresión de proteínas habitual, se cultivó *E. coli* a 37 °C en caldo de Luria-Bertani (LB) complementado con eritromicina (300 µg / ml), ampicilina (100 µg / ml), tetraciclina (10 µg / ml), cloranfenicol (30 µg / ml) o kanamicina (30 µg/ml), según se requiera. Para manipulaciones generales, las cepas de *S. aureus* se cultivaron en caldo de soja triptico (TSB) (Difco) que contenía eritromicina (5 µg/ml), tetraciclina (4 µg/ml), kanamicina y neomicina (50 µg/ml) o cloranfenicol (5 µg/ml), según se requiera. Para los experimentos de cultivo bacteriano con restricción de hierro, se utilizó un medio de succinato mínimo Tris (TMS), cuya composición se ha descrito previamente (Sebulsky et al., (2000) J. Bacteriol. 182: 4394 - 4400). El TMS se complementó con 2'-dipiridilo, a concentraciones descritas en los siguientes Ejemplos, para restringir adicionalmente la concentración de hierro libre en los medios.

Construcciones de plásmidos y cepas

Todas las manipulaciones de ADN y las construcciones de plásmidos se realizaron utilizando protocolos convencionales. El operón *sirABC* se amplificó por PCR del cromosoma 8325-4 de *S. aureus* utilizando la polimerasa de Pwo (Roche Diagnostics) y los cebadores *Sir* superior y *Sir* inferior. El producto resultante de 3,8 kb se clonó en el sitio *SmaI* de pBC SK+ para crear pSirABC.

Para interrumpir la región de codificación *sirA*, pSirABC se digirió con *NsiI*, se rellenó con ADN polimerasa de T4, y se ligó con un casete de resistencia a kanamicina que se había escindido como un fragmento *StuI/SmaI* de pDG782. La región *sirAr::Km* se clonó después en pAUL-A digerido con *BamHI/KpnI*, creando el plásmido pMTS12.

La región codificante de *sirB* se interrumpió por inserción de un casete de resistencia a tetraciclina, derivado de la digestión de pDG1513 con *ClaI* (pulido final con enzima Klenow), en el sitio *StuI* de *sirB*. El fragmento *sirB::tet* se clonó en pAUL-A digerido con *BamHI/KpnI*, creando el plásmido p*SirB::Tet3*.

Para crear cepas portadoras de mutaciones individuales en *sirA* y *sirB*, se introdujeron pMTS12 y p*SirB::Tet3* en *S. aureus* RN4220, seguido de transducción a través del fago 80α, en *S. aureus* RN6390. Los transductantes se confirmaron por análisis de restricción. El reemplazo alélico se realizó por cultivo de bacterias que contenían el plásmido a 30 °C durante tres horas, seguido de un cambio en la temperatura de cultivo a 43 °C durante cuatro horas más. Los eventos cruzados dobles se exploraron con respecto a la resistencia a la kanamicina (para la mutación *sirA::Km*) o la tetraciclina (para la mutación *sirB::Tet*) con una pérdida concomitante de resistencia a la eritromicina en ambos casos. Se utilizaron análisis de PCR y transferencia de Southern para verificar la inserción de los casetes de resistencia a antibióticos en *sirA* y *sirB*. Las cepas mutantes resultantes se denominaron H306 (RN6390 *sirA::Km*) y H474 (RN6390 *sirB::Tet*). Se utilizó transducción para movilizar las mutaciones en diferentes acervos genéticos, tal como *S. aureus* Newman.

Para la complementación de la mutación *sirA::Km*, todo el operón *sirABC* se escindió de pSirABC (utilizando *KpnI* y *BamHI*) y se clonó en pAW8 para crear el plásmido pSED44. Para la complementación de la mutación *sirB::Tet*, la región codificante *sirB* se amplificó por PCR del cromosoma RN6390 de *S. aureus* utilizando los cebadores *SirB* Comp 5' y *SirB* Comp 3', seguido de la digestión con *KpnI* y *Sad* para la clonación direccional en pALC2073, para crear el plásmido pSED43. Vectores complementarios se sometieron a electroporación en RN4220 de *S. aureus* y se transdujeron a cepas mutantes utilizando el bacteriófago 80α utilizando metodologías descritas previamente (Sebulsky et al. (2000) J. Bacteriol., 182: 4394-4400).

RT-PCR

El ARN total para su uso en reacciones de RT-PCR se aisló a partir de cultivos bacterianos en fase logarítmica tardía utilizando reactivo TRIzol® (Invitrogen). Las muestras de ARN se trataron con DNaseI durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de las reacciones de RT-PCR. El kit de Superscript™ RT-PCR de una etapa con Taq Platinum® (Invitrogen) se utilizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se retrotranscribieron 500 ng de ARN total utilizando los cebadores *SirB* Interno 5' y *SirB* Interno 3' para amplificar un fragmento de 399 pb interno a la región codificante *sirB*. Como control interno, se amplificó un fragmento de espacio (gap) de 483 pb (que codifica la gliceroldehído-3-fosfato deshidrogenasa) utilizando los cebadores oligonucleotídicos Gapdh 5' y Gapdh 3'.

Curvas de cultivo bacteriano

Los cultivos de *S. aureus* se pre-cultivaron durante la noche en TMS. Las células se lavaron antes de que aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colonias de cada cepa se inoculasen en medio TMS fresco que contenía 2,2'-dipiridilo 250 μ M (Sigma) con, o sin, FeCl_3 50 μ M. El cultivo bacteriano se controló utilizando un medidor Klett hasta que se alcanzó la fase estacionaria tardía.

Bioensayos en placas de Sideróforo

Se realizaron bioensayos en placa de sideróforo esencialmente como se describe anteriormente (Sebulsky et al. (2000) J. Bacteriol 182: 4394 hasta 4400) con las siguientes modificaciones: el TMS-agar se enfrió a 45 °C antes de la adición de 105 ufc/ml de cada cepa a ensayar. Se añadió 2,2'-dipiridilo con una concentración de 550 μ M para placas que contenían *S. aureus* Newman y controles de vehículo que contenía Newman (por ejemplo, pAW8 y pALC2073) o 2,2'-dipiridilo 400 μ M para las cepas H803 (Newman sirA::Km) y H804 (Newman sirB::Tet) (véase la Figura 1) con o sin plásmidos. El sideróforo de estafilobactina se aisló de RN6390 tal como se describió previamente (Dale et al. (2004) Infect. Immun. 72: 29-37). Brevemente, las cepas de *S. aureus* se agitaron vigorosamente en TMS durante 48 horas a 37 °C. Los sobrenadantes de cultivo se recuperaron por centrifugación en metanol al 100% hasta 1/10 del volumen del sobrenadante de cultivo original y se pasaron a través de papel de filtro Whatman No. 1 para eliminar el material particulado. Se utilizó evaporación rotatoria para reducir el volumen antes de la aplicación a una columna LH-20 (Amersham Biosciences). Se recogieron las fracciones, y las que daban positivo con la solución lanzadera de cromo azul S (CAS) y para la actividad biológica en bioensayos con placa de sideróforo se secaron, se resuspendieron en agua y se examinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La HPLC analítica de fase reversa se utilizó para la purificación final de sideróforo. La columna utilizada fue una columna Waters ODS2 SPherisorb (4,6 por 150 mm). Ácido trifluoroacético (0,1%) en agua se usó como disolvente A, mientras que como disolvente B se utilizó ácido trifluoroacético al 0,1% en acetonitrilo. El método cromatográfico utilizado fue el siguiente: a un caudal de 0,75 ml/min, 6% de B durante 3,5 min., seguido de un gradiente de 6 a 60% de B durante 20 min. La estafilobactina se detectó a 210 nm y tenía un tiempo de retención de aproximadamente 17 minutos. La estafilobactina se recogió, se secó y se volvió a cromatografiar para verificar la pureza. La pureza del sideróforo de estafilobactina se confirmó por análisis de HPLC. La aerobactina se adquirió en las microcolecciones EMC y se utilizó a una concentración de 1 μ g/ml como control en todos los bioensayos.

Ensayos de transporte de ^{55}Fe

Cepas de *S. aureus* se cultivaron hasta la fase logarítmica tardía en TMS que contenía 2,2'-dipiridilo 100 μ M con, o sin, FeCl_3 50 μ M. Las células se lavaron dos veces con TMS sobre un filtro de 0,45 μ m (Gelman) y se normalizaron a una $\text{DO}_{600} = 1,2$. Veinte minutos antes del ensayo, se mezcló $^{55}\text{FeCl}_3$ (75 μ M) con estafilobactina a aproximadamente 220 μ M (calculado a partir de equivalentes de DESFERAL®) en presencia de ácido nitrilotriacético (NTA) 2 μ M y se dejó que llegase al equilibrio a temperatura ambiente. La absorción se inició al añadir 10 μ l de la mezcla de ^{55}Fe -estafilobactina a volúmenes de células de 1 ml. A diversos momentos en el tiempo, se retiraron 200 μ l de células y se lavaron dos veces con LiCl_2 100 mM sobre una membrana de 0,45 μ m. Las membranas se secaron y se realizó un recuento en Cytoscint® líquido utilizando el canal de tritio de un sistema de centelleo Beckman LS 6500. En algunos experimentos, *S. aureus* se trató con cianuro potásico (KCN) 10 mM a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de la adición de la mezcla de ^{55}Fe . Los datos presentados son pmoles de ^{55}Fe transportados normalizados al contenido de proteína total de las células (+/- desviación estándar) según lo determinado por ensayos de Bradford.

Fusiones transcripcionales lacZ y ensayos de β -galactosidasa

La creación de fusiones transcripcionales lacZ a sbnA, sbnF y sbnI ha sido descrita anteriormente (Dale et al. (2004) Infect. Immun. 72: 29-37). Se clonaron fragmentos internos de genes individuales en el sitio de clonación múltiple de pMUTIN4 (Vagner et al., (1998) Microbiology 144: 3097-3104), un vector que no se replica en bacterias Gram-positivas. Estas fusiones se transdujeron en los acervos genéticos H306 y H474 y la presencia de mutaciones y fusiones génicas se confirmó por PCR. La construcción de una fusión transcripcional sbnH::lacZ también se ha descrito anteriormente (Dale et al. (2004) Infect. Immun. 72: 29-37). Esta fusión se transdujo en los acervos genéticos Newman, H803 y H804 y la presencia de la fusión génica se confirmó por PCR.

Para la cuantificación de la expresión de la β -galactosidasa de *S. aureus*, las células se cultivaron hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,8 en TMS complementado con 2,2'-dipiridilo 100 μ M y se ensayaron como se describió anteriormente (Dale et al. (2004) Infect. Immun. 72: 29-37). Brevemente, los cultivos se sometieron a lisis en una solución que contenía tampón de fosfato potásico 10 mM (pH 7,5), EDTA 15 mM, Triton X-100 al 1% y 10 μ g de lisostafina a 37 °C. Después de la centrifugación de los restos celulares, se analizaron 5 μ l de sobrenadante con respecto a la actividad β -galactosidasa utilizando el kit de gen indicador quimioluminiscente Galacto-Light Plus (Tropix) en un luminómetro Berthold. La actividad de fondo se estableció en 50 unidades relativas de luz/s y los datos presentados son unidades relativas de luz media por segundo para tres muestras independientes $\pm$ error típico.

Purificación de Sir A y generación de antisueros anti Sir A

Se expresó SirA, menos el péptido señal, en *E. coli* ER2566 clonando *sirA*, amplificado a partir del genoma de *S. aureus* utilizando los cebadores pSirA (BamHI) y pSirA (EcoRI), en pGEX-2T-TEV digerido con *EcoRI* y *BamHI*. Esta construcción, denominada pSirA, se cultivó durante cuatro horas hasta la mitad de la fase logarítmica antes de ser inducida con IPTG 0,5 mM. Utilizando una prensa francesa, las células se sometieron a lisis y el resultado de la lisis se centrifugó a 40.000 rpm para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante se aplicó a una columna GSTrap (Amersham Biosciences) equilibrada con PBS y la proteína de fusión GST-SirA se eluyó con glutatión reducido 10 mM en Tris-Cl 50 mM, pH 8,0. SirA se escindió de GST a través de incubación con proteasa del virus del tabaco durante 3 horas a temperatura ambiente y se dializó durante la noche a 4 °C frente a Tris-Cl 50 mM, pH 8,0. El SirA se purificó aún más utilizando una columna Mono S (Amersham Biosciences) equilibrada con tampón de fosfato sódico, pH 7,0 y la proteína se eluyó en tampón de fosfato sódico que contenía NaCl 1M. La pureza de SirA se confirmó mediante SDS-PAGE.

En conejos blancos de Nueva Zelanda (Charles River) se generaron anticuerpos que reconocían a SirA, al inocularles por vía subcutánea 500 µg de SirA emulsionado en 100 µl de adyuvante completo de Freund. Los días 14 y 28, los conejos recibieron inyecciones de refuerzo de 100 µg de SirA emulsionado en adyuvante incompleto de Freund. Los conejos se sacrificaron 10 días después del segundo refuerzo. Los antisueros se adsorbieron frente a los lisados celulares H306 y se utilizaron a una dilución de 1: 2000 para las transferencias de Western.

Ejemplo 2: la expresión de SirA está regulada por hierro a través de Fur

Aunque la expresión de SirA era indetectable en *S. aureus* Newman cultivada en medio repleto de hierro (ya sea TSB o TMS que contenía FeCl₃ 50 µM), su expresión pudo detectarse fácilmente durante el crecimiento en condiciones de restricción de hierro (Figura 2). Los niveles de expresión aumentaban a medida que aumentaba el nivel de restricción de hierro (es decir, cuando se añadió 2,2'-dipiridilo a TMS) (Figura 2). Estos hallazgos coinciden con los de estudios previos que utilizaron *S. aureus* 8325-4 (Heinrichs et al. (1999) J. Bacteriol. 181: 1436-1443). Se demostró además que la expresión de SirA estaba controlada por la actividad de la proteína Fur en *S. aureus*, ya que la expresión de SirA ya no estaba regulada por hierro en un fondo deficiente en Fur (Figura 2). Este hallazgo coincide con la presencia pronosticada de una caja Fur consenso en dirección 5' (*upstream, aguas arriba*) de *sirA* (Dale et al. (2004) Infect. Immun. 72: 29-37; Heinrichs et al. (1999) J. Bacteriol. 181: 1436- 1443).

Ejemplo 3: en ausencia de sirB y sirC, el producto génico sirA es tóxico para E. coli

Se realizaron muchos intentos fallidos, utilizando diferentes vectores y sistemas promotores (datos no mostrados), para clonar la región codificante de *sirA* para la complementación de H803. Estos resultados infructuosos indicaron que la expresión "permeable" de incluso pequeñas cantidades de esta lipoproteína era letal para *E. coli*. Los problemas encontrados con la clonación de *sirA* parecen no deberse a las regiones solubles o anfífilas de la proteína ya que, para la generación de antisueros anti-SirA, *sirA* que carece del péptido señal, se clonó satisfactoriamente en un vector de expresión de *E. coli* y se produjeron grandes cantidades de SirA soluble. Estos resultados apoyan la idea de que los problemas encontrados con la clonación de *sirA* pueden deberse a un procesamiento inadecuado de la lipoproteína en *E. coli*.

Sin embargo, curiosamente, el aparente efecto tóxico de la lipoproteína SirA sobre *E. coli*, se produjo solo cuando se realizaron intentos para clonar el gen *sirA* por sí mismo y no cuando *sirB* y *sirC* se incluyeron en el ADN clonado. De hecho, los genes *sirABC* se clonaron satisfactoriamente como una unidad en el plásmido pSirABC (Tabla 1) y este plásmido expresó grandes cantidades de SirA en *E. coli*. Este resultado sugiere que los componentes transmembrana del transportador, componentes que supuestamente interaccionan con SirA en la membrana, pueden ayudar a estabilizar la lipoproteína en la membrana.

Ejemplo 4: SirA y SirB están implicados en la adquisición de hierro.

Los polipéptidos Sir comparten similitud con los componentes de membrana de transportadores ABC (SirB y SirC) y proteínas de unión a ligando (SirA) y, más específicamente, con transportadores implicados en la adquisición de hierro. Para abordar el posible papel de *sirABC* en la adquisición de hierro, se utilizaron casetes de resistencia a kanamicina y tetraciclina para inactivar por inserción las regiones codificantes de *sirA* y *sirB*, respectivamente, en *S. aureus* RN6390. Las mutaciones de cada una de estas cepas, denominadas H306 (*S. aureus* RN6390 *sirA::Km*) y H474 (*S. aureus* RN6390 *sirB::Tet*), se transdujeron a *S. aureus* Newman para crear las cepas H803 (*sirA::Km*) y H804 (*sirB::Tet*). Mientras que SirA era indetectable en H803 (*sirA::Km*), el mutante H804 (*sirB::Tet*) expresó niveles de tipo silvestre de SirA. Una banda ligeramente reactiva que migró más rápido que SirA es visible en los extractos celulares de H803. Esta banda probablemente se deba a la reactividad cruzada con otra proteína debido al antisuero policlonal que se utilizó. Esta banda de proteína probablemente está enmascarada por la expresión de alto nivel de la proteína SirA en las otras muestras analizadas (es decir, la expresión de SirA se detectó en *E. coli* (pSED44) y H686 (*sbnE::Km*)), ya que es visible cuando *S. aureus* Newman se cultiva en condiciones repletas de hierro (Figura 2).

En estudios previos, se ha utilizado la sensibilidad a la estreptonigrina como un método para demostrar la pérdida o la perturbación de la importación de hierro en *S. aureus* (Sebulsky et al. (2000) J. Bacteriol., 182: 4394-4400). La estreptonigrina es tóxica para las células en presencia de hierro intracelular y, por lo tanto, las células que importan hierro son generalmente más sensibles a los efectos tóxicos de este fármaco frente a mutantes con importación de hierro debilitada (Yeowell et al. (1982) Antimicrob. Agents Chemother., 22: 961-968). La concentración mínima inhibidora (CMI) de la estreptonigrina fue aproximadamente 4 veces menor para *S. aureus* Newman cultivado en TMS que para *S. aureus* H803 o H804 cultivadas en los mismos medios (véase la Tabla 2). Las diferentes susceptibilidades a la estreptonigrina se superaron con la inclusión de DESFERAL[®], un agente quelante de hierro, en el medio de cultivo, lo que indica que este sideróforo fue utilizado de igual modo por padres y mutantes. Estos datos indicaron que probablemente SirA y SirB estaban involucrados en el transporte de hierro en la célula. Como evidencia adicional a este respecto, se demostró que la CMI de 2,2'-dipiridilo (un quelante de hierro no metabolizable) para *S. aureus* Newman es 4 veces mayor que para H803 o H804 (Tabla 2).

Durante un período de tiempo de 24-36 horas se hizo un seguimiento del crecimiento de Newman de tipo silvestre y derivados, para identificar deficiencias en la tasa de crecimiento que se correlacionarían con la pérdida de la función de sirA o sirB. En los medios de cultivo repletos de hierro, el crecimiento de H803 (Newman sirA::Km) no se alteró en comparación con Newman (Figura 3A, recuadro). Sin embargo, H803, mostró una deficiencia de crecimiento drástica en comparación con Newman en medios de cultivo restringidos en hierro (Figura 3A). La introducción del plásmido pSED44 (que contiene el operón sirABC expresado de Plac; Figura 1) en H803 corrigió la deficiencia de crecimiento de esta cepa en medios de crecimiento restringidos en hierro. El promotor Plac en el vector pAW8 expresa grandes cantidades de SirA de la construcción pSED44 en *E. coli* pero extremadamente pocas cantidades de SirA en *S. aureus*, incluso en presencia de IPTG 1 mM (datos no mostrados), lo que indica que Plac es funcional pero extremadamente ineficaz en *S. aureus*. Sin embargo, incluso esta pequeña cantidad de SirA fue capaz de complementar la mutación en H803. La adición de IPTG 1 mM a los medios de cultivo deficientes de hierro potenció la complementación (Figura 3). La introducción de vehículo solo en Newman o H803 no afectó a su tasa de crecimiento (Figura 3).

Como no se pudo complementar la mutación sirA::Km con la región codificante sirA sola (véase a continuación), se tuvo que descartar la posibilidad de polaridad de la mutación sirA::Km en la expresión de los genes sir en dirección 3' (aguas abajo). Los experimentos de RT-PCR demostraron que la mutación sirA::Km no tuvo efecto sobre la expresión de sirB (datos no mostrados), mientras que también confirmaron que la expresión del transcrito de sirB estaba regulada por las concentraciones de hierro en el medio de cultivo. Además, sirB no se detectó en H804, la cepa que contiene la mutación sirB::Tet, cultivada en condiciones de inanición de hierro ya que el casete Tet interrumpe la región amplificada en la PCR. En estos experimentos, el ARN total (500 ng) se retrotranscribió y los ADNc en sirB y gap se amplificaron tal como se describe en el Ejemplo 1.

De manera similar a H803, el crecimiento de H804 (Newman sirB::Tet) en medios repletos de hierro no se alteró en comparación con Newman de tipo silvestre (Figura 3B, recuadro). Sin embargo, tal como ocurría con H803, el crecimiento de H804 se vio gravemente afectado en los medios de crecimiento deficientes en hierro en comparación con *S. aureus* Newman (Figura 3B). Esta deficiencia de crecimiento de H804 se alivió con la introducción de pSED43 en la cepa (Figura 3B); pSED43 expresa sirB de un promotor xyl/tet (Figura 1). Se encontró que el promotor xyl/tet era bastante permeable en *S. aureus* (datos no mostrados) y, por lo tanto, en estos experimentos, no fue necesario incorporar inductor (anhidrotetraciclina) en los medios de cultivo para ver la restauración completa del fenotipo de tipo silvestre.

Ejemplo 5: la mutación de SirA y SirB da como resultado *S. aureus* defectuoso en cuanto al transporte de estafilobactina pero no en cuanto a la biosíntesis de estafilobactina

A partir de *S. aureus* RN6390 se aisló estafilobactina utilizando técnicas descritas previamente (Dale et al. (2004) Infect. Immun. 72: 29-37). Se utilizó estafilobactina purificada para evaluar la promoción del crecimiento en bioensayos con placa de sideróforo. Mientras que la estafilobactina promueve fácilmente el crecimiento de *S. aureus* Newman, RN6390 y H287 (fhuG::Tn917) en bioensayos con placa de sideróforo, no se observó promoción del crecimiento mediado por estafilobactina para H306 (RN6390 sirA::Km), H474 (RN6390 sirB::Tet), H803 (Newman sirA::Km) o H804 (Newman sirB::Tet), lo que indica que tanto SirA como SirB son esenciales para el transporte de hierro mediado por estafilobactina. Para confirmar estos resultados, se incubó estafilobactina purificada con ⁵⁵FeCl₃ y se realizaron ensayos de transporte con *S. aureus* Newman y H803. Aunque se observó un transporte significativo de ⁵⁵Fe-estafilobactina en *S. aureus* Newman, prácticamente no se produjo transporte en Newman precultivado en TMS que contenía FeCl₃, en Newman tratado con KCN 10 mM o en H803 (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados confirman que el transporte de estafilobactina es un proceso regulado por hierro que requiere la función de al menos SirA y SirB, y sugieren que este transporte es una reacción que consume ATP. La promoción del crecimiento por aerobactina, DESFERAL[®] y citrato férrico, no se vio afectada en los mutantes sirA y sirB y, en presencia de estafilobactina, el crecimiento se restableció en los mutantes sirA::Km y sirB::tet complementados (datos no mostrados).

Al menos en un caso en *S. aureus*, en el genoma hay más de un gen que codifica el componente de lipoproteína (o proteína de unión) de un sistema de transporte. De hecho, el sistema de absorción de hidroxamato férrico en

muchas cepas de *S. aureus* está compuesto de copias únicas de genes que codifican los componentes del transportador ABC pero dos genes que codifican un componente de proteína de unión (p. ej., *fhuD1* y *fhuD2*) (Sebulsky y Heinrichs (2001)) J. Bacteriol., 183: 4394 - 4400; Sebulsky et al. (2003) J. Biol. Chem. 278: 49890 - 900). En las cepas que contienen tanto *fhuD1* como *fhuD2*, la mutación de uno de los genes conduce a un fenotipo que es de tipo silvestre o muy similar al tipo silvestre, para la absorción de hidroxamato férrico (Sebulsky y Heinrichs (2001) J. Bacteriol. 183: 4394-4400). Dado que las dos mutaciones *sirA::Km* y *sirB::Tet* conducen a fenotipos equivalentes, se llegó a la conclusión de que, para este sistema de transporte, solo hay un gen codificante del componente de proteína de unión (es decir, *SirA*) y una copia de genes (es decir, *sirB* y *sirC*) codificantes de la permeasa de la membrana..

Dado que las funciones de las proteínas expresadas por el operón *sbn* y el operón *sir* están asociadas (es decir, la biosíntesis y la importación de estafilobactina), se quiso determinar si hubo algún efecto sobre su expresión como función de las mutaciones en los operones. La mutación de *sbnE* produce la pérdida de la síntesis de estafilobactina (Dale et al. (2004) Infect. Immun. 72: 29-37), sin embargo, se demostró que la pérdida de función de *sbnE* y, por lo tanto, la biosíntesis de estafilobactina, no tenía un efecto importante sobre la expresión de *Sir A* (datos no mostrados). En experimentos corolarios, se investigó si la pérdida de *sirA* o *sirB* daba como resultado la pérdida, o la disminución, de producción de estafilobactina. Se observó que H803, cultivado en medios moderadamente restringidos en hierro, producía cantidades significativas de estafilobactina tanto por HPLC analítica como por espectrometría de masas-ESI (datos no mostrados). Para investigar más este fenómeno, se transdujo una fusión transcripcional *lacZ-sbnH* en Newman, H803 y H804. Se observó un aumento significativo en la transcripción del gen *sbnH* en los acervos genéticos H803 y H804 en comparación con Newman de tipo silvestre (Tabla 3). No se observó transcripción de actividad β -galactosidasa cuando las cepas que contenían la fusión se cultivaron en condiciones repletas de hierro (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la biosíntesis de estafilobactina puede potenciarse en cepas deficientes en cuanto a la capacidad para transportar este sideróforo, presumiblemente en respuesta a un estado elevado de inanición de hierro.

Ejemplo 6: Materiales y métodos para los ejemplos 7-12

Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo

En la Tabla 4 se describen cepas bacterianas y plásmidos utilizados en los Ejemplos 7-12. La bacteria *E. coli* se cultivó en caldo de Luria-Bertani (Difco). Para experimentos que no estaban involucrados directamente en el análisis de absorción de hierro, se cultivó *S. aureus* en caldo de soja triptico (Difco). Se preparó succinato de tris mínimo (TMS) tal y como se describe en Sebulsky et al. (2004) J. Biol. Chem. 279: 53152-9 y se utilizó como un medio mínimo limitado en hierro. Para restringir aún más el nivel de hierro libre en TMS, se añadieron los compuestos quelantes de hierro 2,2'-dipiridilo y ácido etilendiamina-di(o-hidroxifenol acético) (EDDHA) tal como se indica en el texto. Cuando fue necesario, se incorporó ampicilina (100 μ g/ml) o kanamicina (30 μ g/ml) en los medios para el cultivo de las cepas de *E. coli*. Para *S. aureus*, según las necesidades, se incorporó cloranfenicol (5 μ g/ml), kanamicina (50 μ g/ml), neomicina (50 μ g/ml), eritromicina (3 μ g/ml) y lincomicina (20 μ g/ml) en los medios de cultivo. Los medios sólidos se obtuvieron por adición de Bactoagar al 1,5% (p/v) (Difco). A menos que se indique lo contrario, todo el cultivo bacteriano se realizó a una temperatura de 37 °C. Para la preparación de los medios y soluciones de cultivo se preparó agua sin hierro pasándola a través de un sistema de filtración de agua Milli-Q (Millipore Corp.).

Metodología de ADN recombinante

Las manipulaciones de ADN estándar se realizaron esencialmente como describen Sambrook et al. (Sambrook et al. (1989) Cloning molecular: A Laboratory Manual, 2ª ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor). Las endonucleasas de restricción y las enzimas modificadoras de ADN se adquirieron en Roche Diagnostics (Laval, Quebec, Canadá), New England Biolabs (Mississauga, Ontario, Canadá), Life Technologies Inc. (Burlington, Ontario, Canadá) y MBI Fermentas (Flamborough, Ontario, Canadá). El ADN plasmídico se purificó utilizando columnas de espín de plásmido QIAprep (QIAgen Inc., Santa Clarita, California) tal como describe el fabricante. Para el aislamiento del plásmido de *S. aureus*, se añadió lisostafina (50 μ g/ml) a un tampón P1. El ADN cromosómico de *S. aureus* se aisló utilizando la Matriz InstaGene™ (Bio-Rad) según lo descrito por el fabricante. Las reacciones en cadena de la polimerasa se realizaron con ADN polimerasa de *Pwo* o *Taq* (Roche Diagnostics).

Construcción de un mutante Δ fhuCBG::ermB

Para crear una delección del operón *fhuCBG* en el cromosoma de RN6390, dos regiones de ADN flanqueante del operón del cromosoma de RN6390 se amplificaron por PCR. Los cebadores *fhuC* codificante (*sense*) en dirección (aguas arriba) 5' (5'-TTGAATTCAATACCTCGATGTAAGCACG-3') y *fhuC* no codificante (*antisense*) en dirección (aguas arriba) 5' (5'-TTGGATCCACGATTC ATAATTTCCCTAC-3') se utilizaron para amplificar un fragmento de 709 pb en dirección 5' (aguas arriba) de y que incluía los 9 primeros pb del marco de lectura abierto de *fhuC*, y cebadores *fhuG* codificante en dirección 3' (aguas abajo) (5'-TTGGATCCACGAAAAATGTATAGTGTC-3') y *fhuG* no codificante (antisentido) en dirección 3' (aguas abajo) (5'-TTTCTAGACGGCAAGCTTATGAACAAAC-3') se utilizaron para amplificar un fragmento de 718 pb en dirección 3' (aguas abajo) de *fhuGG* que incluía los 13 pb

finales del marco de lectura abierto de *fhuG*.

El fragmento en dirección 5' (aguas arriba) de *fhuC* se digirió con *EcoRI* y *BamHI* (los sitios de reconocimiento se indican subrayados en las secuencias cebadoras) y el fragmento *fhuC* en dirección 3' (aguas abajo) se digirió con *BamHI* y *XbaI* (los sitios de reconocimiento se indican subrayados en las secuencias cebadoras) y estos dos fragmentos se clonaron conjuntamente en pUC19 digerido con *EcoRI* y *XbaI*. La construcción resultante se digirió con *BamHI* y se insertó un fragmento *BamHI* de 1,6 kb procedente de pDG646, que portaba el gen *ermB*. La construcción plasmídica resultante se digirió con *EcoRI* y *XbaI* y un fragmento de 3027 pb que albergaba *ermB* entre los fragmentos *fhuC* en dirección 5' (aguas arriba) y *fhuC* en dirección 3' (aguas abajo), se ligó en pAUL-A Km digerido con *EcoRI* y *XbaI* para crear el plásmido pΔ*fhuCBG*.

El plásmido pΔ*fhuCBG* se introdujo en *S. aureus* RN4220 por electroporación y después de realizar un cultivo a 30 °C se seleccionaron las colonias resistentes a kanamicina y a neomicina. Los clones resistentes a kanamicina se sometieron a un cambio de temperatura a 42 °C para seleccionar la integración del plásmido en el cromosoma. Se seleccionaron bacterias que eran resistentes a eritromicina y a lincomicina pero sensibles a kanamicina y a neomicina. La mutación Δ*fhuCBG::ermB* se confirmó mediante PCR y la mutación se transdujo posteriormente a los acervos genéticos RN6390 y Newman para crear las cepas H1071 y H1074, respectivamente.

Construcción de plásmidos complementarios

Con el fin de complementar la mutación Δ*fhuCBG::ermB*, pMTS20 (Sebulsky et al. (2000) J. Bacteriol. 182: 4394-4400) se digirió con *BamHI* y el fragmento resultante de 3,7 kb, que albergaba el operón *fhuCBG* con aproximadamente 400 pb de ADN en dirección 5' (aguas arriba) (que abarcaba la caja Fur y las secuencias promotoras), se ligó en el sitio *BamHI* de pLI50 para crear p*fhuCBG*. Para crear p*fhuC*, se utilizaron los cebadores *fhuCBG2* (5'-TTTGG ATCCACAAGTTTCAAAAGCAAAGC-3') y *fhuC* no codificante (5'-TTGGATCCATTTGTCATGTTAATTGTCC-3') para amplificar una región de 1,2 kb que contenía la región codificante *fhuC* más la misma región en dirección 5' (aguas arriba) de 400 pb que en p*fhuCBG*, y el producto de PCR resultante se clonó en el sitio *BamHI* de pLI50.

Sideróforos

El ferricromo se adquirió en Sigma (Mississauga, Ontario, Canadá), la desferrioxamina B, utilizada como DESFERAL® (Novartis), se obtuvo en el London Health Sciences Centre (Londres, Ontario) y enterobactina se adquirió en la EMC Microcollections GmbH (Tübingen, Alemania). La estafilobactina se preparó tal como se ha descrito anteriormente en Dale et al. (2004) J. Bacteriol. 186: 8356 - 62.

Bioensayos

Los bioensayos con placa de sideróforo se realizaron esencialmente tal como describen Sebulsky et al. (2000) J. Bacteriol., 182: 4394-4400. Resumiendo, 10⁴ células/ml se añadieron a agar TMS fundido que, como agente quelante de hierro, contenía EDDHA 25 μM. Diez microlitros de fuentes de hierro a ensayar (DEFERAL® (50 μM), ferricromo (50 μM), enterobactina (500 μM), estafilobactina (equivalentes a 50 μM de DEFERAL®), hemina (250 mg/ml), hemoglobina (2 mg/ml), FeCl₃ (50 mM), o citrato férrico (5 mM)), se añadieron a discos de papel estériles de 6 mm de diámetro y se colocaron en la superficie de las placas. El ascenso del crecimiento, medido por el diámetro del halo de crecimiento alrededor de cada disco, se determinó después de 48 h de incubación, a excepción del grupo hemo y la hemoglobina, cuya medición se realizó después de 72 horas.

Determinación de la concentración inhibidora mínima de 2,2'-dipiridilo para cepas de *S. aureus*

Las cepas a ensayar se precultivaron TMS y las células se lavaron en TMS fresco antes del ensayo. Se añadió 2,2'-dipiridilo al TMS y se diluyó en serie para proporcionar un intervalo de 1 mM a 32 μM. Después de la dilución en serie, se añadieron 5x10⁴ UFC a cada cultivo de 5 ml y después de 24 horas de incubación se registró el crecimiento.

Curvas de crecimiento bacteriano

Las cepas se precultivaron durante la noche en TMS. Las células se lavaron con TMS y se añadieron 5x10⁶ UFC a 50 ml de TMS fresco o TMS complementado con 2,2'-dipiridilo 50 μM en matraces lavados con ácido. Cuando se precisaba se añadía FeCl₃ 50 μM a los medios para crear condiciones repletas de hierro. El crecimiento bacteriano se controló midiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm (DO₆₀₀) hasta que se alcanzó la fase estacionaria.

Ensayos de transporte de ⁵⁵Fe

La absorción de sideróforo se midió tal como se ha descrito anteriormente (Dale et al. (2004) J. Bacteriol. 186: 8356-62) con las siguientes modificaciones: todas las cepas se cultivaron durante la noche en TMS que contenía 2,2'-dipiridilo 50 μM y antibióticos apropiados, con la excepción de Δ*fhuCBG::ermB* (H1071) de RN6390, que se cultivó

en TMS solo. Las células se lavaron tres veces en TMS y se normalizaron a una densidad óptica a 600 nm de 2,0. Los sideróforos (DESFERAL[®] y estafilobactina, 200 µM cada uno) se mezclaron con ⁵⁵FeCl₃ (75 µM) en presencia de ácido nitrilotriacético 4 µM y las mezclas se equilibraron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La absorción de hierro se inició al añadir 10 µl de cada mezcla de ⁵⁵Fe-sideróforo a 1 ml de células. A

5 diversos momentos se retiraron 200 µl de células y se lavaron dos veces con LiCl 100 mM sobre una membrana de tamaño de poro de 0,45 µM (Pall Gelman). Las membranas se secaron y se realizó un recuento en Cytoscint[®] líquido utilizando el canal de tritio de un sistema de centelleo Beckman LS 6500. En algunos experimentos, las bacterias se expusieron a cianuro potásico 10 nM durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de iniciar la absorción con las mezclas de ⁵⁵Fe-sideróforo. Los datos presentados son los picomoles de ⁵⁵Fe

10 transportados normalizados a la densidad óptica de los cultivos.

Modelo de absceso renal de ratón

Se adquirieron ratones hembra Swiss-Webster (con un peso de 25 g cada uno de ellos) en Charles River Laboratories Canadá Inc., y se instalaron en jaulas de microaislamiento. *S. aureus* Newman y Newman Δ*fhuCBG::ermB* (H1074), se cultivaron durante la noche en TSB, se lavaron tres veces con solución salina estéril y se prepararon suspensiones de 1x10⁸ ufc/ml en solución salina estéril. Se administraron cien microlitros de las suspensiones celulares por vía intravenosa a través de la vena de la cola. El número de bacterias viables inyectadas se confirmó sembrando en placa diluciones en serie de los inóculos en agar TSB. Durante el experimento, los

15 hábitos de aseo y la función locomotora de los ratones, recibieron una puntuación de manera subjetiva. Una puntuación de 1 indicaba una función normal, mientras que las puntuaciones más altas indicaban una función alterada (véanse los Resultados más adelante). El día 7, los ratones se sacrificaron y los riñones se extirparon de un modo aséptico y se homogeneizaron en PBS estéril + Triton X-100 al 0,1% utilizando un homogeneizador PowerGen 700. Los homogeneizados se diluyeron en serie y se sembraron en placas sobre agar TSB para contar las bacterias

20 recuperadas. Los datos presentados son el log de las UFC recuperadas por ratón. La significación del porcentaje de los riñones que presentaban abscesos visibles en cada grupo se determinó utilizando la prueba Z y la prueba exacta de Fisher.

25

Análisis informáticos

Los análisis de secuencias de ADN y el diseño de cebadores oligonucleotídicos de la PCR se realizaron utilizando el paquete informático Vector NTI Suite 7 (Informax, Inc.). Para los análisis de datos y aplicaciones gráficas se utilizaron los programas Microsoft Excel y SigmaPlot (SPSS Inc.).

Ejemplo 7: construcción del mutante Δ*fhuCBG::ermB* de *S. aureus*

El operón *fhuCBG* regulado por hierro se identificó previamente en nuestro laboratorio (Sebulsky et al. (2000) J. Bacteriol., 182: 4394-4400) y por Xiong et al. (Xiong et al. (2000) Microbiology 146: 659-668), y se mostró que era necesario para el transporte del complejo hidroxamato-hierro(III) en *S. aureus* ya que las mutaciones en *fhuB* o *fhuG* eliminaban el transporte (Cabrera et al. (2001) Appl Environ. Microbiol., 67: 1001 - 3; Sebulsky et al. (2000) J. Bacteriol., 182: 4394 - 4400). El operón está presente en todos los genomas de *S. aureus* secuenciados (Sebulsky et al. (2004) J. Biol. Chem. 279: 53152-9). Como parte de nuestros estudios para aclarar el mecanismo del transporte del sideróforo de hierro (III) en *S. aureus* utilizando como modelo el sistema *fhu*, construimos una cepa de *S. aureus* en el acervo genético de RN4220, H1068, que contenía una delección en el operón *fhuCBG* (véase la

40 Figura 4). La mutación se movilizó por transducción de fagos a los acervos genéticos de RN6390 y Newman, creando las cepas H1071 y H1074, respectivamente.

45

Ejemplo 8: un mutante Δ*fhuCBG::ermB* no puede utilizar complejos de hidroxamato-hierro(III)

De acuerdo con los resultados anteriores que indican que la pérdida de *fhuG* o *fhuB* produce una completa incapacidad para utilizar cualquiera de los complejos de hidroxamato-hierro(III) para el cultivo en medios con restricción de hierro, los bioensayos de placas mostraron que la cepa H1071 fue incapaz de utilizar DESFERAL[®], ferricromo, coprogen y aerobactina. La cepa H1071 fue capaz de utilizar todos los sideróforos de hidroxamato mencionados anteriormente para la adquisición de hierro en bioensayos de sideróforo en placa cuando dicha cepa

50 estaba provista con el operón *fhuCBG* en *trans*, en el plásmido p*FhuCBG* (datos no mostrados).

55

Ejemplo 9: la mutación de *fhuC*, en *S. aureus*, pero no de otros genes *fhu*, produce un defecto de crecimiento en medios con restricción en hierro

Los resultados de nuestro laboratorio, no publicados anteriormente, indican que las mutaciones de *fhu* en *S. aureus*, por ejemplo RN6390 *fhuG::Tn917* (H287) y RN6390 *fhuD1::Km fhuD2::Tet* (H431), no presentan un defecto evidente de crecimiento en medios con deficiencia de hierro, lo que sugiere que *S. aureus* no produce sideróforos de hidroxamato en respuesta a la inanición de hierro; de acuerdo con esto, los sobrenadantes del cultivo de *S. aureus* dieron negativo a los hidroxamatos en la prueba de Czaky (Payne (1994) Detection, isolation, and characterization of siderophores, págs. 329-344. En VL Clark y P. M. Bavoil (ed.), Methods in Enzymology, vol. 235. Academic Press, Inc., San Diego, CA) (datos no mostrados). Sin embargo, sorprendentemente, observamos que el crecimiento de

60

65

H1071 se retrasó significativamente en comparación con el de RN6390 de tipo silvestre, H287 (RN6390 *fhuG*) y H431 (RN6390 *fhuD1 fhuD2*) en medios de TMS deficientes en hierro (datos no mostrados) y aún más en TMS que contiene 2,2'-dipiridilo 50 μ M, un quelante de hierro no metabolizable (datos no mostrados). La adición de cloruro férrico 50 μ M a TMS restauró el crecimiento de H1071 a niveles de tipo silvestre, demostrando que el crecimiento alterado se debió únicamente al nivel de hierro disponible para las bacterias (datos no mostrados). El defecto del crecimiento en medios con restricción de hierro demostrado por H1071 podría complementarse con la introducción de un plásmido que porta el operón (pFhuCBG). Sin embargo, fue más sorprendente la observación de que *fhuC* solo en *trans*, presente en el plásmido pFhuC, complementó la deficiencia de crecimiento restringida en hierro de la cepa H1071, lo que indica que el defecto de crecimiento de H1071 fue como resultado de la incapacidad para expresar *fhuC*. Se realizaron ensayos de absorción de ^{55}Fe -Desferal® y mostraron que H1071 era incapaz de transportar ^{55}Fe -DESFERAL® (datos no mostrados), lo que corrobora los resultados del bioensayo (véase anteriormente). Sin embargo, cabe destacar la observación de que aunque pFhuC podía complementar la deficiencia de crecimiento de H1071, no podía restaurar la capacidad de H1071 para transportar ^{55}Fe -DESFERAL® (datos no mostrados). Es de notar, sin embargo, la observación que a pesar que pFhuC pudo complementar la deficiencia de crecimiento de H1071, no pudo restaurar la capacidad de H1071 para transportar ^{55}Fe -DESFERAL® (datos no mostrados), lo que corrobora los resultados anteriores que mostraban que para la absorción de hidroxamato-hierro (III) también se requerían FhuB y FhuG (Cabrera et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67: 1001-3; Sebulsky et al. (2000) J. Bacteriol. 182: 4394-4400), pero también indican que en H1071 se vio interrumpido un sistema adicional de transporte de sideróforo de hierro (III), uno que se requiere para el crecimiento restringido de hierro en *S. aureus*.

Como se esperaba, y de acuerdo con resultados anteriores que muestran que ninguna cepa con el gen *fhuB* (Cabrera et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67: 1001-3) o *fhuG* (Sebulsky et al. (2000) J. Bacteriol. 182: 4394 - 4400) desactivado, puede utilizar sideróforos de tipo hidroxamato, el mutante Δ fhuCBG::ermB no fue capaz de transportar hidroxamatos-hierro (III) como se demostró mediante el bioensayo de sideróforo en placa y en ensayos de transporte, y este defecto se complementó con la introducción de *fhuCBG* en *trans* por completo. El hecho de que el mutante Δ fhuCBG::ermB mostrase un defecto de crecimiento dependiente de hierro en medios solo con TMS, fue sorprendente, dado que las cepas que carecen de *fhuG* o de *fhuD1* y *fhuD2* no muestran ningún defecto de crecimiento medible en condiciones similares en comparación con RN6390 de tipo silvestre. Dada nuestra observación de que la introducción de *fhuC* en H1071 restauraba el defecto de crecimiento pero no restauraba la capacidad de utilizar hidroxamatos-hierro(III), se sugirió que en la cepa mutante estaba alterado un sistema endógeno de absorción de hierro.

Ejemplo 10: se requiere FhuC para el transporte de estafilobactina-hierro(III) en *S. aureus*

FhuC (Sebulsky et al. (2000) J. Bacteriol., 182: 4394-4400) comparte una similitud significativa con las ATPasas y tiene todas las características (secuencias de firma) de una proteína de unión a ATP (Holland y Blight (1999) J. Mol. Biol. 293: 381 - 99). El análisis del genoma de *S. aureus* identificó varios operones cuyos productos esperados compartían una similitud significativa con los transportadores de tipo ABC de sideróforo-hierro(III) y las proteínas de unión a sideróforo-hierro(III). Sin embargo, al menos tres de estos supuestos operones, SirABC, IsdEF y SA1977-SA1979 (utilizando denominaciones del genoma de N315), carecen de un gen cuyo producto esperado comparte similitud con componentes de ATPasa de transportadores ABC. Por lo tanto, es posible que FhuC interactúe con uno o más de estos otros transportadores ABC de *S. aureus* para transportar un complejo de hierro que se requiere para el crecimiento en condiciones de limitación de hierro. Nuestros estudios previos caracterizaron el fenotipo de los mutantes SirA y SirB, los cuales demuestran un fenotipo con crecimiento alterado en condiciones de limitación de hierro y que demostramos que se requerían para el transporte de estafilobactina-hierro(III) (Dale et al., 2004). J. Bacteriol. 186: 8356 - 62). Por lo tanto, se ensayó la capacidad de H1071 de utilizar estafilobactina en ensayos de transporte de ^{55}Fe -estafilobactina. Estos resultados mostraron que H1071 no podía utilizar estafilobactina (Figura 5, recuadro). Además, la complementación de este mutante con pFhuCBG y, más notablemente, con solo pFhuC, dio como resultado un transporte significativo de estafilobactina (Figura 5), lo que indica que FhuB y FhuG no están implicados en el transporte de estafilobactina y que FhuC (como la ATPasa), junto con SirABC (SirA, proteína de unión; SirB y SirC, permeasa) (Dale et al. (2004) J. Bacteriol. 186: 8356-62; Heinrichs et al. (1999) J. Bacteriol. 181: 1436-1443) participa en el transporte de estafilobactina. Aunque no se observó en el intervalo de 10 minutos de los ensayos de transporte, observamos una zona de crecimiento reproduciblemente menor en los bioensayos de placas de 48 horas de duración para la utilización de estafilobactina por H1071 complementada con pFhuCBG en comparación con la complementación con el plásmido pFhuC.

Atribuimos esta observación a la posibilidad de que la expresión de las proteínas FhuB y FhuG en el primero podría secuestrar a FhuC en un complejo de membrana FhuCBG, disminuyendo la posibilidad de una posible interacción de FhuC con SirABC y, por lo tanto, dando como resultado una menor capacidad de transportar estafilobactina-hierro(III). Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad menos probable de que la disminución de la utilización de estafilobactina en la cepa complementada con pFhuCBG se deba a una expresión más pobre de FhuC de esta construcción en comparación con la de la cepa complementada con pFhuC. La expresión de FhuC de ambas construcciones se rige por secuencias idénticas en dirección 5' (aguas arriba) y, como las cepas se cultivaron en las mismas condiciones, es probable que la expresión de FhuC de ambas construcciones fuera bastante equivalente.

Ejemplo 11: FhuC interacciona con transportadores de hierro adicionales

Anteriormente mostramos que un mutante de *S. aureus* *sirA* era incapaz de transportar estafilobactina (Dale et al. (2004) J. Bacteriol. 186: 8356-62), y que este mutante mostraba un fenotipo de crecimiento deficiente en hierro. Sin embargo, la falta de *fhuC* en H1071 (aunque H1071 presenta delección en *fhuCBG*, recuerda que el plásmido pFhuC complementa el defecto de crecimiento en esta cepa) da como resultado un defecto de crecimiento más atenuado en respuesta a la inanición de hierro que un mutante *sirA* o *sirB* (Dale et al. al. (2004) J. Bacteriol. 186: 8356 - 62). De hecho, nuestro uso de medios restringidos en hierro, tales como TMS, que contiene suficiente hierro contaminante para permitir el crecimiento de mutantes de absorción de hierro, y la capacidad de añadir concentraciones crecientes de 2,2'-dipiridilo, un quelante de hierro no metabolizable, nos permite la oportunidad de separar las contribuciones de varios transportadores de hierro diferentes. La inclusión de 2,2'-dipiridilo 50 µM en TMS atenúa contundentemente el crecimiento de H1071 en comparación con el tipo silvestre, mientras que atenuación de crecimiento equivalente solo se observa para H306 (RN6390 *sirA::Km*) y H474 (RN6390 *sirB::Tet*) cuando las concentraciones de 2,2'-dipiridilo en TMS son superiores a 100 µM (Dale et al. (2004) J. Bacteriol. 186: 8356-62). Junto con los resultados descritos anteriormente, estas observaciones sugieren que no solo FhuC interacciona con SirABC para transportar estafilobactina, sino que FhuC también está interaccionando con un transportador adicional que permite el transporte de un quelante de hierro aún no determinado. En un intento por determinar cuáles eran los quelantes de hierro adicionales de FhuC que podían participar en el transporte de hierro, utilizamos bioensayos de placas con H1071 utilizando una gama de posibles fuentes de hierro, entre las que se incluían enterobactina, citrato férrico, hemina y hemoglobina. En estas condiciones, H1071 no se alteró significativamente en cuanto a la utilización de ninguna de estas fuentes de hierro adicionales (datos no mostrados).

Basándose en estos resultados, es evidente que para el transporte de sideróforos de hidroxamato-hierro (III) se requiere *fhuC* y el sideróforo de estafilobactina aún no caracterizado estructuralmente. Los datos también respaldan la conclusión de que *fhuC* está probablemente involucrado en el transporte de un sistema adicional de adquisición de hierro (es decir, además de los sistemas codificados por *fhu* y *sir*). Esto se basa en la observación de que el defecto de crecimiento restringido en hierro mostrado por el mutante $\Delta fhuCBG$, es más intenso que el de un mutante *sirA* o *sirB* durante el crecimiento en condiciones con bajo contenido en hierro. En la actualidad, se desconoce la identidad de la ruta (o rutas) adicional(es) afectada(s) por la delección de *fhuC*, sin embargo, el mutante *fhuCBG* todavía era capaz de utilizar hemina, hemoglobina, citrato férrico y la enterobactina, un sideróforo de tipo catecol, a niveles equivalentes a RN6390 en bioensayos, demostrando que la pérdida de *fhuC* no afecta a la capacidad de *S. aureus* para obtener hierro a partir de estas fuentes. Es tentador especular que FhuC interacciona con uno o ambos de IsdEF o SA1977-1979 para proporcionar el componente ATPasa que desde el punto de vista genético no está ligado a estos transportadores. Las proteínas codificadas por el locus *isd* se han implicado en interacciones con complejos de hierro del hospedador (Mack et al. (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun. 320: 781-8; Mazmanian et al. (2003) Science 299: 906-9; Skaar y Schneewind. (2004) Microbes Infect. 6: 390-7), complejos que no estaban presentes en los medios de laboratorio de TMS que se utilizaron para demostrar el defecto del crecimiento con restricción de hierro. Por lo tanto, no fue sorprendente encontrar que H1071 no se vio afectado, en comparación con el tipo silvestre, en la absorción de un grupo hemo o hemoglobina. La región genética que rodea a SA1977-1979 contiene varios marcos de lectura abiertos cuyos supuestos productos comparten similitud con enzimas biosintéticas de sideróforo y por tanto es posible que la falta de FhuC en H1071 anule la utilización de otro sideróforo estafilocócico cuya producción requiere la expresión de genes dentro de este locus.

Ejemplo 12: el mutante $\Delta fhuCBG::ermB$ muestra un perfil de patogenicidad alterado en un modelo de absceso renal de ratón

Anteriormente hemos demostrado que la biosíntesis de sideróforos es importante para la virulencia de *S. aureus* en un modelo de absceso renal de ratón (Dale et al. (2004) Infect. Immun. 72: 29-37). Dado que hemos mostrado que H1071 (RN6390 $\Delta fhuCBG::ermB$) se vio comprometido por la absorción de estafilobactina, estábamos interesados en determinar si este mutante también se atenuaba en este sistema modelo. Grupos de siete ratones Swiss-Webster fueron inoculados con 10^7 UFC de *S. aureus* Newman o H1074 (Newman $\Delta fhuCBG::ermB$) a través de la vena de la cola y todos los días se comprobaban los hábitos de aseo y la función locomotora de los ratones. Cada día, a los ratones se les asignaba una puntuación subjetiva que reflejaba su salud relativa. Por ejemplo, los ratones que recibieron una puntuación de 1 eran normales tanto para los hábitos de aseo como para la función locomotora, mientras que los ratones que recibieron puntuaciones de 4 eran ratones completamente moribundos. Para explicar la muerte antes del criterio de valoración final del experimento (un ratón infectado con Newman murió el día 6), las puntuaciones clínicas se dividieron entre el número de días que sobrevivieron para llegar a una puntuación clínica final. La mortalidad de los ratones a los que se les inyectó H1074 fue significativamente menor que la de los ratones a los que se les inyectó *S. aureus* Newman (tabla 5; puntuaciones clínicas de 1,8 frente a 2,7, respectivamente - un ratón completamente sano tendría una puntuación clínica de 1,4). El día 7, los ratones se sacrificaron, se extirparon los riñones y se evaluó la formación de abscesos. Ocho de catorce riñones (57%) extraídos de ratones a los que se les inyectó *S. aureus* Newman, presentaban absceso, mientras que solo 2 de 14 riñones (14%) extraídos de ratones a los que se les inyectó H1074, presentaban formación visible de absceso. Estos resultados mostraron ser muy significativos ($p < 0,0001$) utilizando la prueba Z y la prueba exacta de Fisher. Sin embargo, curiosamente, cuando los homogeneizados de riñón se sembraron en placa para enumerar las bacterias totales, no hubo diferencias significativas en cuanto a la carga bacteriana en los riñones entre los ratones inyectados con Newman en

comparación con H1074 (datos no mostrados).

Estos resultados demostraron que la patogenicidad de una cepa Newman $\Delta fhuCBG::ermB$ se alteró en comparación con la cepa precursora Newman ya que, en comparación con el tipo silvestre, el mutante H1074 causó significativamente menos abscesos renales y menos pérdida de peso sin una reducción en la carga bacteriana en los riñones. Estos resultados indicaron que la falta del potencial para expresar FhuCBG (la expresión *in vivo* de los genes *fhu* no se había demostrado hasta ahora pero se deduce basándose en su perfil de expresión regulado por hierro *in vitro*) no afecta a la capacidad de las bacterias para persistir *in vivo*, pero parece disminuir su potencial para causar una infección más grave. Estos resultados contrastan con los resultados previos que muestran que un mutante Newman *sbnE::Km* (incapaz de producir el sideróforo estafilobactina) dio como resultado menos bacterias en los riñones 6 días después de la infección. El hecho de que la expresión de FhuCBG, al menos en este sistema modelo, parece ser necesaria para el potencial de virulencia total de *S. aureus*, está en consonancia con la conservación de este operón en todos los genomas de *S. aureus* secuenciados hasta ahora (Sebulsky et al. (2004) J. Biol. Chem. 279: 53152-9), a diferencia de *fhuD1* que está ausente en los genomas de N315 y MRSA252.

Ejemplo 13: ensayos de interacción

Los ensayos para explorar agentes que alteran la interacción de polipéptidos Sir, estafilobactina y/o proteína FhuC se llevarán a cabo de la siguiente manera. Una microplaca de 96 pocillos con alta capacidad de adsorción de proteínas se recubrirá con estreptavidina durante la noche a 4 °C a una concentración de 30 µg/ml en tampón PBS (NaCl 0,15 M, pH 6,8) 1 vez. Después de retirar la solución, la placa se bloqueará con BSA al 2% en tampón PBS durante una hora o más a temperatura ambiente. Después, la placa se lavará y se utilizará en el ensayo. Por ejemplo, SirA y SirB biotinilados en ausencia o presencia de un agente de ensayo se incubarán durante 45 a 60 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con agua, se añadirá un anticuerpo anti-SirB mezclado con un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (FA) o peroxidasa de rábano picante (PRP) y se incubará durante una hora. La placa se lavará para separar el complejo de anticuerpo unido del libre. Se utilizará un sustrato quimioluminiscente (fosfatasa alcalina o solución de luminol Super Signal de Pierce para la peroxidasa de rábano picante) para detectar el anticuerpo unido. Se utilizará un luminómetro de microplaca para detectar la señal quimioluminiscente. La ausencia de la señal indicará que el agente de ensayo inhibe o altera la unión de sirA con sirB. También se pueden realizar ensayos similares para identificar agentes que alteran la interacción de sirA y sirC, sirB y sirC y/o sirA, sirB, sirC, estafilobactina y/o FhuC.

Ejemplo 14: ensayos de transporte de hierro

Los ensayos para explorar agentes que alteran el sistema de transporte de hierro de *S. aureus* se llevarán a cabo de la siguiente manera. Células de *S. aureus* de tipo silvestre y de *S. aureus* deficientes en SirA se cultivarán en caldo de soja triptico (TSB) (Difco). Las células se lavarán antes de que se inoculen aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colonias de cada cepa en medio de TMS fresco que contiene $FeCl_3$ 50 µM en presencia o ausencia de un agente de ensayo. El crecimiento bacteriano se comprobará utilizando un medidor Klett hasta que se alcance la fase estacionaria tardía.

Un agente de ensayo que altere la tasa de crecimiento de células de *S. aureus* de tipo silvestre pero no la de células deficientes en SirA es probablemente tóxico para las células en presencia de hierro intracelular y, por lo tanto, las células que importan hierro son generalmente más sensibles a los efectos tóxicos de este fármaco en comparación con mutantes con importación de hierro debilitada.

Se pueden llevar a cabo ensayos de transporte similares para SirB, SirC y FhuC utilizando células deficientes en SirB, SirC y/o FhuC.

Ejemplo 15: ensayos de expresión

Los ensayos para explorar agentes que alteran la expresión de SirA en *S. aureus* se llevarán a cabo de la siguiente manera. Células de *S. aureus* de tipo silvestre se cultivarán durante una noche en caldo de soja triptico (TSB) (Difco) en presencia o ausencia de un agente de ensayo. Después de 24 horas de cultivo, las células se lavarán 1 vez en PBS (solución salina tamponada con fosfato) y después se someterán a lisis a 37 °C utilizando 10 µg de lisostafina en STE (NaCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM [pH 8,0], EDTA 1 mM [pH 8,0]). Los lisados celulares se transferirán después a placas previamente recubiertas con anticuerpo anti-SirA y se incubarán durante 45 a 60 minutos a temperatura ambiente. Como control, se utilizarán lisados celulares de células de *S. aureus* no tratadas. Después de tres lavados con agua, se añadirá un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (FA) o peroxidasa de rábano picante (PRP) y se incubará durante una hora. Después, la placa se lavará para separar el complejo de anticuerpo unido del libre. Se utilizará un sustrato quimioluminiscente (fosfatasa alcalina o solución de luminol Super Signal de Pierce para la peroxidasa de rábano picante) para detectar el anticuerpo unido. Se utilizará un luminómetro de microplaca para detectar la señal quimioluminiscente. La ausencia de la señal en muestras de lisados celulares obtenidos de células tratadas con agente de ensayo indicará que el agente de ensayo inhibe la expresión de SirA. También se pueden realizar ensayos de expresión similares para SirB, SirC, estafilobactina y/o FhuC.

- La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Dichas técnicas se describen en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, volúmenes I y II (DN Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (MJ Gait ed., 1984); Mullis et al. Patente de Estados Unidos N°. 4.683.195; Nucleic Acid Hybridization (BD Hames y S. J. Higgins eds. 1984); Transcription and Translation (B.D. Hames y SJ Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); el tratado, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, volúmenes 154 y 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer y Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); Antibodies: A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1987)), Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en los Ejemplos 2-5

Cepas bacterianas, plásmidos u oligonucleótidos	Descripción ^a	Fuente o referencia
<i>E. coli</i>		
DH5a	$\phi 80dlacZ\Delta M15$ <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r_K- m_K⁺) supE44 relA1 deoR $\Delta(lacZYA-argF)U169$</i>	Promega
ER2566	<i>Fλ: fhuA2 [lon] ompT / acZ::T7 genel gal sulAll $\Delta(mcrC-mrr)114::IS10$ R(mcr-73::miniTn10)2 R(zgb-210::Tn10)1 (Tet^s) endA1 [dcm]</i>	New England Biolabs
<i>S. aureus</i>		
RN4220	Deficiente en enzimas de restricción; admite ADN exógeno	Reserva de laboratorio
8325-4	Profago-cepa de tipo silvestre curada	Reserva de laboratorio
RN6390	Profago-cepa de tipo silvestre curada	Reserva de laboratorio
Newman	Aislado clínico; cepa de tipo silvestre	Reserva de laboratorio
H287	RN6390 <i>fhuG</i> ::Tn917; Em ^r	Sebulsky ¹
H306	RN6390 <i>sirA</i> ::Km; Km ^r	Este estudio
H474	RN6390 <i>sirB</i> ::Tet; Tet ^r	Este estudio
H686	Newman <i>sbnE</i> ::Km	Dale ²
H706	Newman <i>fur</i> ::Km; Km ^r	Este estudio
H789	RN6390 <i>sirA</i> ::Km, <i>sbnF</i> ::pMUTIN4; Km ^r Em ^r	Este estudio
H790	RN6390 <i>sirA</i> ::Km, <i>sbnI</i> ::pMUTIN4; Km ^r Em ^r	Este estudio
H791	RN6390 <i>sirA</i> ::Km, <i>sbnA</i> ::pMUTIN4; Km ^r Em ^r	Este estudio
H796	RN6390 <i>sirB</i> ::Tet <i>sbnF</i> ::pMUTIN4; Tet ^r Em ^r	Este estudio
H797	RN6390 <i>sirB</i> ::Tet <i>sbnI</i> ::pMUTIN4; Tet ^r Em ^r	Este estudio
H800	RN6390 <i>sirB</i> ::Tet <i>sbnA</i> ::pMUTIN4; Tet ^r Em ^r	Este estudio
H803	Newman <i>sirA</i> ::Km; Km ^r	Este estudio
H804	Newman <i>sirB</i> ::Tet; Tet ^r	Este estudio
H870	Newman <i>sbnH</i> ::pMUTIN4	Este estudio
H873	H803 <i>sbnH</i> ::pMUTIN4	Este estudio
H876	H804 <i>sbnH</i> ::pMUTIN4	Este estudio
Plásmidos		
pGEX-2T-TEV	Vector de expresión para generar fusiones de proteínas con GST que son escindibles con proteasa del virus del grabado del tabaco, el vector	Sebulsky ³
pALC2073	lanzadera de <i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> , contiene P _{xyl/tet} ; Cm ^r	A. Cheung
pAUL-A	Vector lanzadera de <i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> sensible a temperatura;	Chakraborty ⁴
pAW8	Vector lanzadera de <i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> ; Tef	A. Wada
pBC SK+	Fagémido de <i>E. coli</i> ; Cm ^r	Stratagene
pDG782	Derivado de pMLT22 que lleva un casete de resistencia a kanamicina; Ap ^r Km ^r	Guerout-Fleury ⁵
pDG1513	Derivado de pMLT22 que lleva un casete de resistencia a tetraciclina; Cm ^r Te ^r	Guerout-Fleury ⁵
pMTS 12	Derivado de pAUL-A que lleva <i>sirA</i> ::Km; Km ^r Em ^r	Este estudio
pMUTIN4	Vector de fusión lacZ; Ap ^r (<i>E. coli</i>) Em ^r (<i>S. aureus</i>)	Vaguer ⁶
pSED43	Derivado de pALC2073 que lleva la región codificante de <i>sirB</i> ; Cm ^r	Este estudio

(continuación)

Cepas bacterianas, plásmidos u oligonucleótidos	Descripción ^a	Fuente o referencia
pSED44	Derivado de pAW8 que lleva <i>sirABC</i> ; Tet ^r	Este estudio
pSirA	Derivado de pGEX-2T-TEV que lleva <i>sirA</i> ; Amp ^r	Este estudio
pSirABC	pBC SK+ que lleva <i>sirABC</i> ; Cm ^r	Este estudio
pSirB::Tet3	Derivado de pAUL-A que lleva <i>sirB</i> ::tet; Tet ^r Em ^f	Este estudio
<i>E. coli</i>		
Oligonucleótidos ^b		
pSirA (BamHI)	GCAATGGGTACAGGATCCATTAAAGGGAAACCAAAG	
pSirA (EcoRI)	TTGAATTCGTAGCATCGTAAACTCCTT	
SirB Comp 5'	TTGGTACCGCGGATATAAATCTTCATT	
SirB Comp 3'	TTGAGCTCTTTCGGTCATAAGCGTTGAC	
Sir superior	TCACGAAGGAGGCTAATTAG	
Sir inferior	CCTCGCAACGGTTAGTTAAC	
SirB Interno 5'	5' CAGCTACGGCTACCGAAATA	
SirB Interno 3'	5' CATTTTGGGGGCTATTGTTGT	
Gapdh 5'	GGAGGCCATTACCATGGCAG	
Gapdh 3'	TGCTCCCCGCTTACTCATAA	
^a Abreviaturas: Cm ^r , Tet ^r , Em ^r , Km ^r , Amp ^r : resistencia a cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, kanamicina y ampicilina, respectivamente.		
^b Se subrayan los sitios de reconocimiento de las endonucleasas de restricción.		
¹ Sebulsky et al. (2000) J. Bacteriol. 182:4394-4400		
² Dale et al. (2004) Infect. Immun. 72:29-37		
³ Sebulsky et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:49890-900.		
⁴ Chakraborty et al. (1992) J. Bacteriol. 174:568-574		
⁵ Guerout-Fleury et al. (1995) Gene 167:335-336		
⁶ Vaguer et al. (1998) Microbiology 144:3097-3104		

Tabla 2. Concentraciones inhibitoras mínimas (CIM) de estreptonigrina y 2, 2'-dipiridilo contra *S. aureus* Newman y derivados

Cepa bacteriana	CIM ^a	
	Estreptonigrina (ng/ml)	2,2'-dipiridilo (μM)
Newman	2	500
H803	8	125
H804	8	125
Newman + DESFERAL® 50 μM	2	nd ^b
H803 + DESFERAL® 50 μM	2	nd
H804 + DESFERAL® 50 μM	2	nd

^a las bacterias se cultivaron en TMS

^b no determinada

5

Tabla 3. Actividad β-galactosidasa de fusiones *sbn-lacZ* en Newman y derivados cultivados en medios con restricción de hierro

Los valores representan los valores medios, por triplicado, de ensayos realizados en cultivos por triplicado

Cepa bacteriana	Media (actividad β-galactosidasa ± DT (URL/s))
Newman	172 ± 117
H803	318 ± 47
H804	239 ± 110
H870: Newman <i>sbnH</i> ::pMUTIN4	825 ± 190
H873: H803 <i>sbnH</i> ::pMUTIN4	7036 ± 517
H876: H804 <i>sbnH</i> ::pMUTIN4	3667 ± 1654

10

Tabla 4. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en los Ejemplos 7-12

Cepa o plásmido	Descripción ^a	Fuente o referencia
Strains		
<i>S. aureus</i>		
RN4220	rk ⁻ mk ⁺ ; capaz de aceptar AND exógeno	Kreiswirth ¹
RN6390	Profago-cepa de tipo silvestre curada	Peng ²
Newman	Cepa de tipo silvestre	Duthie ³
H287	RN6390 <i>fluG</i> ::Tn917; Em ^f	Sebulsky ⁴

(continuación)

Cepa o plásmido	Descripción ^a	Fuente o referencia
H431	RN6390 <i>fhuD1::Km fhuD2::Tet</i> ; Km ^r Tet ^r	Sebulsky ⁵
H1068	RN4220 Δ <i>fhuCBG::ermB</i> ; Em ^r	Este estudio
H1071	RN6390 Δ <i>fhuCBG::ermB</i> ; Em ^r	Este estudio
H1074	Newman Δ <i>fhuCBG::ermB</i> ; Em ^r	Este estudio
<i>E. coli</i>		
DH5 α	ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r ^k m ^k +) <i>supE44 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Promega
Plásmidos		
pAUL-A	Vector suicida de <i>S. aureus</i> sensible a temperatura; Em ^r	Chakraborty ⁶
pAUL-A Km	pAUL-A que contiene un casete de resistencia a kanamicina de 1,6 kb (insertado como fragment <i>Clal</i>) de pDG782; Em ^r Km ^r	Este estudio
pDG646	Derivado de pSB119 que lleva un casete de resistencia a eritromicina; Ap ^r Em ^r	Guerout-Fluery ⁷
pDG782	Derivado de pMTL22 que lleva un casete de resistencia a kanamicina; Ap ^r Km ^r	Guerout-Fluery ⁷
pAFhuCBG	Derivado de pAULA Km que lleva <i>fhuCBG::ermB</i> ; Em ^r Km ^r	Este estudio
pLI50	Vector lanzadera de 5,2 kb de <i>E. coli</i> / <i>S. aureus</i> ; Ap ^r Cm ^r	Lee ⁸
pUC19	Vector de clonación de <i>E. coli</i> con fines generales; Ap ^r	Sambrook ⁹
pFhuC	pLI50 que contiene el gen <i>fhuC</i> de <i>S. aureus</i> ; Ap ^r Cm ^r	Este estudio
pFhuCBG	pLI50 que contiene el operón <i>fhuCBG</i> de <i>S. aureus</i> ; Ap ^r Cm ^r	Este estudio

^a Abreviaturas: Ap^r, Cm^r, Em^r, Km^r, Tet^r indican resistencia a ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina y tetraciclina, respectivamente.

¹Kreiswirth et al. (1983) Nature 305:680-685.

²Peng et al. (1988) J. Bacteriol. 170:4365-4372.

³Duthie and Lorenz (1952) J. Gen. Microbiol. 6:95-107.

⁴Sebuskly et al. (2000) J. Bacteriol. 182:4394-4400.

⁵Sebuskly and Heinrichs (2001) J. Bacteriol. 183:4994-5000.

⁶Chakraborty et al. (1992) J. Bacteriol. 174:568-574.

⁷Guerout-Fleury et al. (1995) Gene 167:335-336.

⁸Lee (1992) Mol. Microbiol. 6:1515-1522.

⁹Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual, 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Tabla 5. Características clínicas de ratones infectados con *S. aureus* Newman y H1074.

Número de raton y cepa de infección	Formación de Absceso ^a	% de pérdida (aumento) de peso	Puntuación clínica ^b
1-Newman	A/A	26	3,3
2-Newman	A/A	33	2,9
3-Newman	A/-	31	2,6
4-Newman	-/-	13	2,9
5-Newman ^c	A/A	43	3,8
6-Newman	-/-	7	1,6
7-Newman	A/-	12	2,0
Promedios:^d		22,1 $\pm$ 4,8	2,7 $\pm$ 0,3
1-H1074	-/-	8	1,4
2-H1074	-/-	19	1,7
3-H1074	A/A	33	2,7
4-H1074	-/-	26	2,4
5-H1074	-/-	15	1,9
6-H1074	-/-	4	1,4
7-H1074	-/-	(1)	1,4
Promedios:		14,8 $\pm$ 4,6	1,8 $\pm$ 0,2
1- Inyección de solución salina	-/-	(12)	1,4

^a A/A, absceso visible en ambos riñones; A/-, absceso visible en un riñón; -/- sin absceso visible en ningún riñón.

^b Las puntuaciones clínicas se basaron en los hábitos de aseo y función locomotora durante el experimento, normalizadas al número de días que los ratones sobrevivieron.

^c El ratón se sacrificó el día 6 a causa de una extrema morbilidad.

^d Los promedios son $\pm$ error típico de la media.

Equivalentes

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, utilizando únicamente experimentación habitual, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Se
5 pretende que dichos equivalentes estén incluidos en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para identificar un agente que inhibe una interacción entre proteínas de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) seleccionadas del grupo que consiste en SirA y SirB, SirA y SirC, SirB y SirC, SirB y FhuC y SirC y FhuC que comprende:
- 10 (i) poner en contacto las proteínas, o ácidos nucleicos que codifican las proteínas, en presencia y en ausencia de un agente, en condiciones que permitan la interacción entre las dos proteínas; y
- (ii) determinar el nivel de interacción entre las proteínas, en el que un nivel de interacción diferente entre las proteínas en presencia del agente en relación a en ausencia del agente, indica que el agente inhibe la interacción entre las proteínas.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el agente es una molécula orgánica pequeña, un péptido, un polipéptido, un peptidomimético o un anticuerpo.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el agente es un polinucleótido.
4. El método de la reivindicación 3, en el que el agente es un polinucleótido antisentido.
- 20 5. El método de la reivindicación 3, en el que el agente es siRNA.
6. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que el agente inhibe la interacción entre FhuC y SirB o SirC.
- 25 7. Uso de un agente para inhibir el crecimiento de células de *S. aureus*, en el que el agente se hibrida o se une específicamente con ARNm o ADN genómico que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 16.

Figura 1

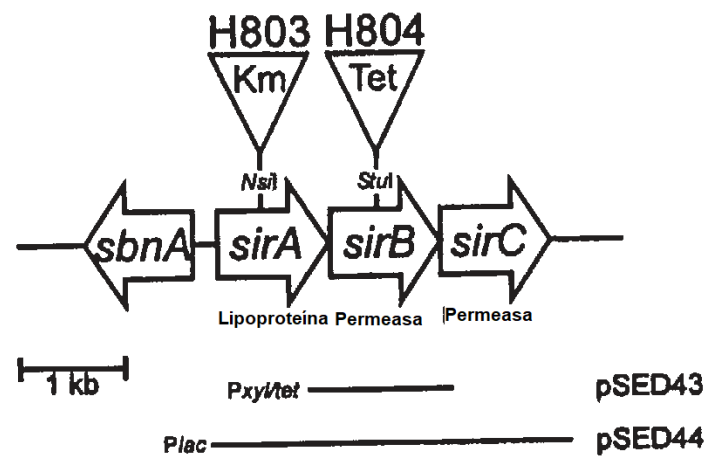


Figura 2

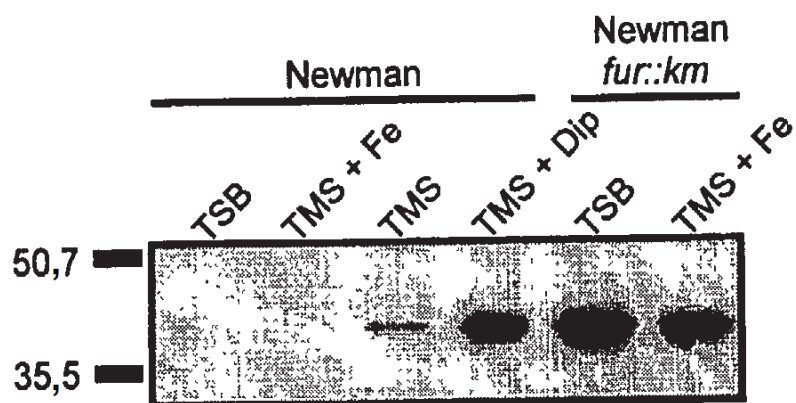


Figura 3

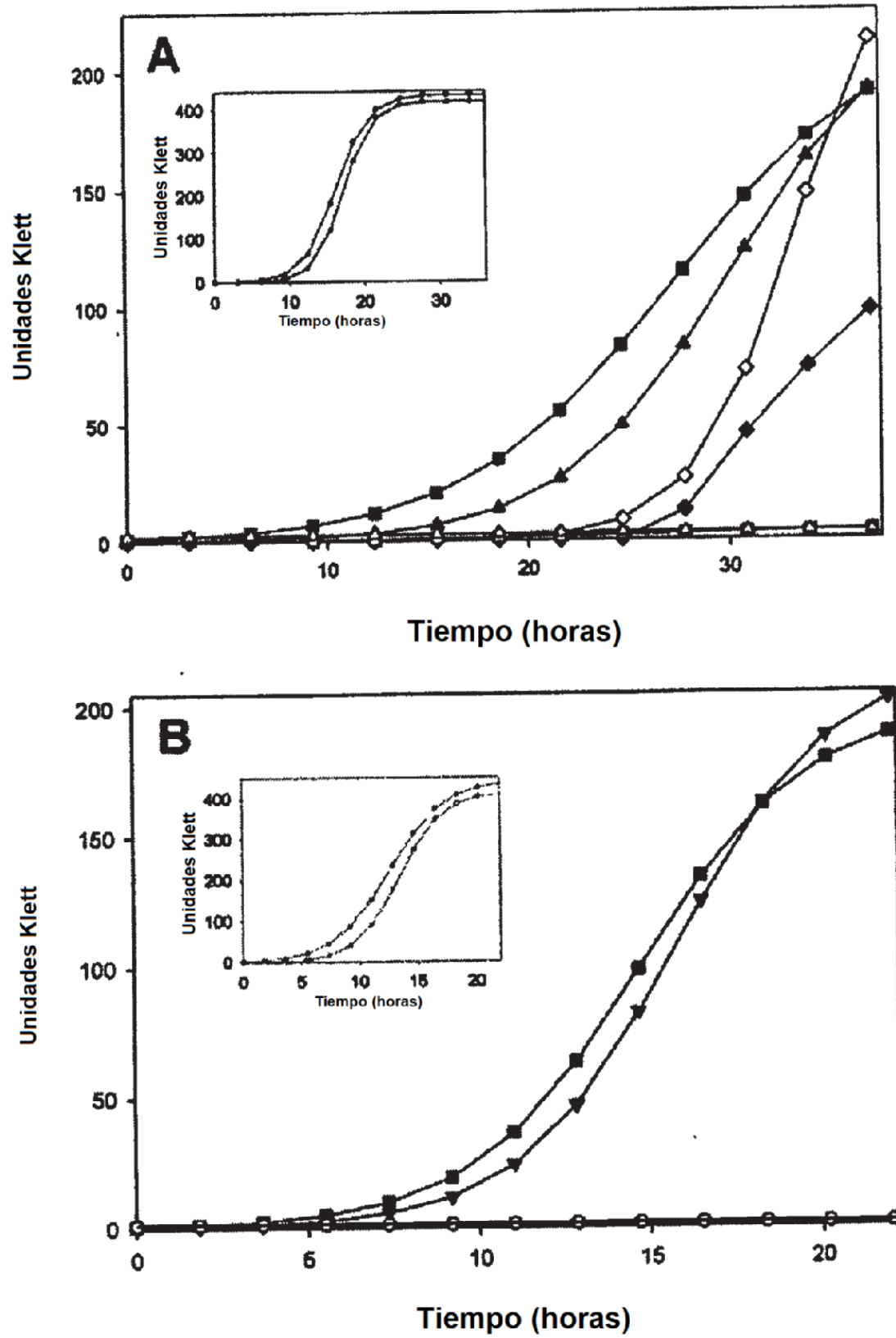


Figura 4

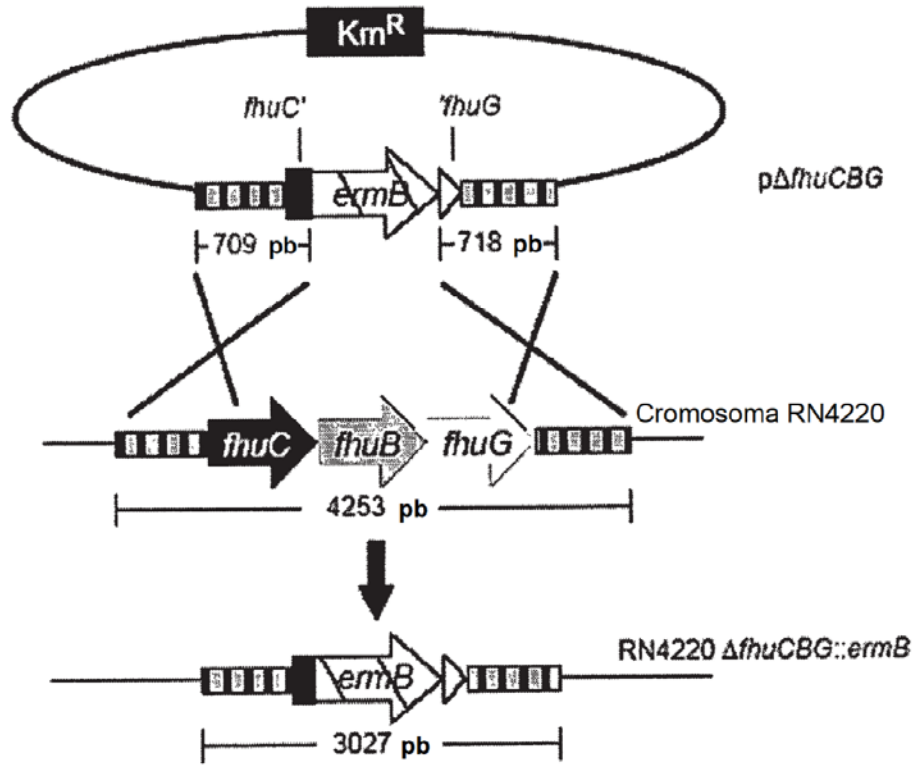


Figura 5

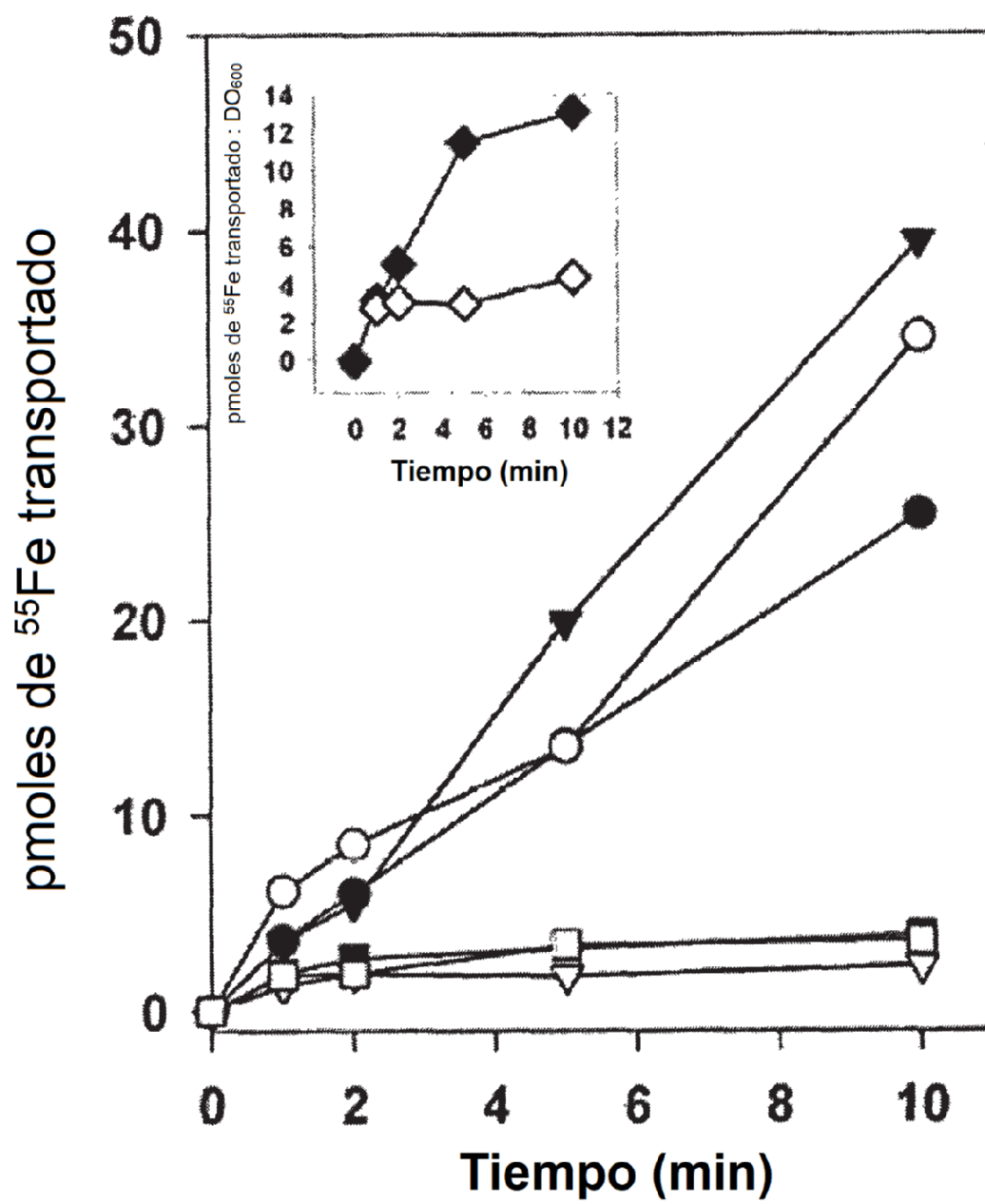


Figura 6**A.**

```

1 aaaaaattta attcatacta aatcgtgata atgattctca ttgtcataca tcacgaagga
61 ggctaattag tcaatgaata aagtaattaa aatgcttggt gttacgcttg ctttcctact
121 tgtttttagca ggatgtagtg ggaattcaaa taaacaatca tctgataaca aagataagga
181 aacaacttca attaaacatg caatgggtac aactgaaatt aaagggaaac caaagcgtgt
241 tgttacgcta tatcaagggtg ccaactgacgt cgctgtatct ttaggtgtta aacctgtagg
301 tgctgtagaa tcatggacac aaaaaccgaa attcgaatac ataaaaaatg atttaaaaga
361 tactaagatt gtaggtcaag aacctgcacc taacttagag gaaatctcta aattaaaacc
421 ggacttaatt gtcgctcaa aggttagaaa tgaaaaagtt tacgatcaat tatctaaaat
481 cgcaccaaca gtttctactg atacagtttt caaattcaaa gatacaacta agttaatggg
541 gaaagcttta gggaaagaaa aagaagctga agatttactt aaaaagtacg atgataaagt
601 agctgcattc caaaaagatg caaaagcaaa gtataaagat gcatggccat tgaaagcttc
661 agttgttaac ttccgtgctg atcatacaag aatttatgct ggtggatatg ctggtgaaat
721 cttaaagatg ttaggattca aacgtaataa agacttaca aaacaagttg ataatggtaa
781 agatattatc caacttacat ctaaagaaag cattccatta atgaacgctg atcatatctt
841 tgtagtaaaa tcagatccaa atgcgaaaga tgctgcatta gttaaaaaga ctgaaagcga
901 atggacttca agtaaagagt ggaaaaattt agacgcagtt aaaaacaacc aagtatctga
961 tgatttagat gaaatcactt ggaacttagc tggcggatat aaatcttcat taaaacttat
1021 tgacgattta tatgaaaagt taaatattga aaaacaatca aaataattaa ggagttttac
1081 gatgctactt aaacccaaaat accaaatcgt tattgctggt ttatgtcttg caatagtagc
1141 tatcttaagt ttaatgattg gaaatacgtt tgtgtcacca ggtacggtga tacaggcgtt
1201 attcaacttt gatagtgaac acgatttaca tgatgttgct actggtgcac gggcgtcgag
1261 aacaatcatt gcgttattga ctggtgctgc ccttgctgtc tcagggttgt tgatgcaagc
1321 acttacacga aacccaatag cctcaccagg gcttttcggt gtcaatgcag gcgcagtatt
1381 ttttgcattt tttagtatta catttatcca aattcaatct tttaaaatga ttgtagttat
1441 tgcatttttg ggggctattg ttgttactgt attagtgtgt gcactaggta tgtttagaca
1501 aacactattc tcacctcacc gtgtcatttt ggcaggtgct gcgattgcga tgctatttac
1561 agcctttact caaggcatac ttattatgaa cgaaacagac ttacaaggcc tattattttg
1621 gttaagtggc tccgtttcat tacgtaatat ttgggatata ccatggatta ttccgcttgt
1681 attgatactt attttaattg catttagcat ggctgcacac atcaacatct tgatgacaag
1741 tgacgacatt gcaaccggcc tcggtcaaaa cataaaatta atcaaatgga tgattattat
1801 gctcatcagt atgttagccg gtatttcggt agccgtagct ggatcaatcg tctttgtggg
1861 tcttatcgta ccgaatatta gcaaacgatt attaccacca aactataagt atttaattcc
1921 ttttactgca ttagctggag caatccta at gatcatttca gacattgttg ctcgtataat
1981 aattaagcca ctagagttgc ctatcgggtg cgttaccgct gtcattggcg ctattgtctt
2041 aatctatatt atgaagaaag gacgtcaacg cttatgaccg aaaagattaa taaaaagac
2101 aattaccatc tcatcttcgc gttaatcttt ttagccatcg ttccagtggg aagtatgatg
2161 attggttcaa gctttatacc attacaacgc gtactgatgt actttataaa tccaaatgac
2221 agtatggatc aattcacttt agaagtatta cgcttacctc gcattacact tgcgatttta
2281 gcaggtgccg cactaggaat gagtggttta atgttgcaaa atgtattaaa aaatccaatt
2341 gcctcacctg atattatcgg tatcacaggg ggtgctagct taagtgtgtt tgtctttatt
2401 gcatttttca gccatttaac aatacattta cttccactat ttgcagtatt aggtggcgca
2461 gttgcaatga tgatactatt agtgtttcaa acgaaaggac aaatacgccc gacaacactc
2521 ataatcatcg gtatttcgat gcaaacgttg tttattgcgc ttgtccaagg attactcatt
2581 acaacgaagc aattatctgc tgccaaagct tatacatggc tagtcggaag tctttacggg
2641 gctacgttta aagatacaat cattttgggt atggttattt tagctgttgt gccgttggtt
2701 tttcttggtt taccaaaaat gaaaatatct atacttgatg accctgtagc gattggctta
2761 ggcttacatg tacaacgtat gaaactaatc caattaatca cttctactat actcgtatct
2821 atggcaatca gtttagtagg taacattggg tttgtcgggt taatcgcacc acatatcgcg

```

2881 aaaacaatcg ttgcggaag ttatgctaaa aagtactaa tgtcagcaat gattggtgcc
 2941 atatcaattg ttattgcaga ctttaattggg cgtaccttat tcttgccata agaagtgcc
 3001 gcagggtgat ttattgctgc ttttggtgcc ccattcttca tatacttatt attaaccgtg
 3061 aaaaagttat aacgatatta ttaaaacaaa atgacctac aacgaagta gctaaatgat
 3121 tcagttaact aaccgttgcg aggtttttt atacatatag ttgtgttat tgtaacaag
 (SEQ ID NO: 1)

B.

cttgtaacaataacaacaactatatgtataaaaaaacctcgcaacggttagttaactgaatcatttagct
 aacttcgttgtaggtcattttgttttaataatatcggtataactttttcacggttaataataagtatatg
 aagaatggggcaccaaaagcagcaataaatacacctgctggcacttctttaggcaagaataaggtacgccc
 aattaagtctgcaataacaattgatatggcaccaatcattgctgacattagtaacttttttagcataacttc
 cgcaacgattgttttcgcatatgtggtgcgattaaaccgacaaaccaatgttacctactaaactgatt
 gccatagatacaggtatagtagaagtgaattggattagtttcatacgttgtaacgttaagccaaagcc
 aatcgctacaggtcatcaagtatagatatctttcatttttgggtataacaagaaataacaacggcacaacag
 ctaaaataaccatacccaaatgattgtatcttttaaacgtagcaccgtaaaagacttccgactagccatgta
 taagctttggcagcagataattgcttcgttgtaagtgaatccttggaacgcaataaacaacggtttg
 catcgaaataccgatgattatgagtggttcgggcgtattgtcctttcgtttgaaacactaatagtatca
 tcattgcaactgctgcacctaatactgcaaatagtggaaagtaaatgtattgttaaatggctgaaaaatgca
 ataaagacaacgacttaagctagcaccacctgtgataccgataaatatcaggtgaggcaattggattttt
 taatacattttgcaacattaaaccactcattcctagtgcggcacctgctaaaatcgcaagtgaatgcgag
 gtaagcgaataacttctaaagtgaattgatccatactgtcatttggatttataaagtacatcagtagcggt
 tgtaattggtataaaagcttgaaacatcatcacttaccactgaaacgatggctaaaaagattaacgcgaa
 gatgagatggtaattgtcttttttattaatcttttcggtcataagcgttgacgtcctttcttcataatata
 gattaagacaatagcgcaatgacagcggttaacgacaccgataggcaactctagtggcttaattattatac
 gagcaacaatgtctgaaatgatcattaggattgctccagctaattgcagtaaaaggaattaaatacttatag
 tttggtggtataaatcggttgctaatattcggtacgataagaccacaaagacgattgatccagctacggc
 taccgaaataccggctaacatactgatgagcataataatcatccatttgatttaattttatgttttgaccga
 ggccggttgcaatgtcgtcacttgtcatcaagatggtgatgtgtgcagccatgctaaatgcaattaaaata
 agtatcaatacaagcggaataatccatgggatatcccaaatattacgtaattgaaacggagccacttaacca
 aaataataggccttgtaagtctgtttcgttcataataagtagccttgagtaaaaggctgtaaatagcactg
 caatcgacgacctgccaataatgacacgggtgaggtgagaatagtgtttgtctaaacatacactagtgcaca
 actaatacagtaacaacaatagcccccaaaaatgcaataactacaatcatttttaaaagattgaatttggat
 aaatgtaataactaaaaatgacaaaaaataactgcgcctgcattgacaccgaaaagccctgggtgaggctattg
 ggtttcgtgtaagtgttgcatcaacaaacctgagacagcaagggcagcaccagtcaataacgcaatgatt
 gttctcgacgcccgtgcaccagtgaacaacatcatgtaaatcgttttcactatcaaagttgaataacgcctg
 tatcacctacctgggtgacacaagcgtatttccaatcattaaacttaagatagctactattgcaagacata
 aaccagcaataacgatttgggtattttggtttaagtagcatcgtaaaactccttaattattttgattgtttt
 tcaatatttaacttttcatataaatcgctcaataagtttttaagatttatatccgccagctaagttcca
 agtgattttcatctaaatcatcagatacttggttggttttaactgcgtctaaatttttccactctttacttg
 aagtccattcgctttcagtccttttaactaatgcagcatctttcgcatttggatctgattttactacaaaa
 atatgatcagcggtcattaatggaatgctttcttttagatgtaagttggataatatctttaccattatcaac
 ttgtttttgtaagtctttattacgtttgaatcctaaatcatttaagatttcaccagcatatccaccagcat
 aaattcttgatgatcagcagcgaagttaacaactgaagctttcaatggccatgcactttatacttttgct
 tttgcatctttttggaatgcagctactttatcatcgtacttttaagtaaatcttcagcttctttttcttt
 ccctaaagctttccccattaacttagttgtatctttgaattgaaaactgtatcagtagaaactgttggtg
 cgatttttagataattgatcgtaaaacttttctttcacttttgacgagacaattaagtcgggttttaaat
 ttagagatttctctaaagttaggtgcaggttcttgacctacaatcttagtatcttttaaatcattttttat
 gtattcgaaatttcggtttttgtgtccatgattctacagcacctacaggtttaacacctaaagatacagcga
 cgtcagtggcaccttgatatagcgtaacaacacgctttgggtttcccttaatttcagttgtacccattgca
 tgtttaattgaagttgtttccttatctttgttatcagatgattgtttatttgaattcccactacatcctgc

ES 2 660 341 T3

taaaacaagtaggaaagcaagcgtaacaacaagcattttaattactttattcattgactaattagcctcct
tcgtgatgtatgacaatgagaatcattatcacgatttagtatgaattaaatttttt (SEQ ID NO: 2)

Figura 7**A.**

1 atgaataaag taattaaaat gcttgttgtt acgcttgctt tcctacttgt tttagcagga
 61 tgtagtggga attcaaataa acaatcatct gataacaaag ataaggaaac aacttcaatt
 121 aaacatgcaa tgggtacaac tgaaattaaa gggaaaccaa agcgtgttgt tacgctatat
 181 caaggtgcca ctgacgtcgc tgtatcttta ggtgttaaac ctgtagggtgc tgtagaatca
 241 tggacacaaa aaccgaaatt cgaatacata aaaaatgatt taaaagatac taagattgta
 301 ggtcaagaac ctgcacctaa cttagaggaa atctctaaat taaaaccgga ctttaattgtc
 361 gcgtcaaaaag ttagaaatga aaaagtttac gatcaattat ctaaaatcgc accaacagtt
 421 tctactgata cagttttcaa attcaaagat acaactaagt taatggggaa agctttaggg
 481 aaagaaaaag aagctgaaga tttactttaa aagtacgatg ataaagtagc tgcattccaa
 541 aaagatgcaa aagcaaagta taaagatgca tggccattga aagcttcagt tgtaaacttc
 601 cgtgctgatc atacaagaat ttatgctggg ggcattgctg gtgaaatctt aaatgattta
 661 ggattcaaac gtaataaaga cttacaaaaa caagttgata atggtaaaga tattatccaa
 721 cttacatcta aagaaagcat tccattaatg aacgctgac atatTTTTgt agtaaaatca
 781 gatccaaatg cgaaagatgc tgcattagtt aaaaagactg aaagcgaatg gacttcaagt
 841 aaagagtggg aaaatttaga cgcagttaaa aacaaccaag tatctgatga tttagatgaa
 901 atcacttggg acttagctgg cggatataaa tcttcattaa aacttattga cgatttatat
 961 gaaaagttaa atattgaaaa acaatcaaaa taa (SEQ ID NO: 3)

B.

ttattttgattgtttttcaatatTTAACTTTTCATATAAATCGTCAATAAGTTTAAATGAAGATTTATATC
 CGCCAGCTAAGTTCOAAGTGATTTCTATAATCATCAGATACTTGGTTGTTTTAACTGCGTCTAAATTT
 TTCCACTCTTTACTTGAAGTCCATTCGCTTTCAGTCTTTTTAACTAATGCAGCATCTTTCGATTGGATC
 TGATTTTACTACAAAAATATGATCAGCGTTCATTAATGGAATGCTTCTTTAGATGTAAGTTGGATAATAT
 CTTTACCATTATCAACTTGTTTTTGTAAGTCTTTATTACGTTTGAATCCTAAATCATTTAAGATTTACCA
 GCATATCCACCAGCATAAATCTTGTATGATCAGCACGGAAGTTAACAACCTGAAGCTTTCAATGGCCATGC
 ATCTTTATACTTTGCTTTTGCATCTTTTGGGAATGCAGCTACTTTATCATCGTACTTTTAAAGTAAATCTT
 CAGCTTCTTTTCTTTCCCTAAAGCTTTCCCATTAAGTTAGTTGTATCTTTGAATTTGAAAAGTGTATCA
 GTAGAACTGTTGGTGCGATTTTAGATAATTGATCGTAACTTTTCTTTCTAAGTTTGTACGCGACAAT
 TAAGTCCGGTTTTAATTTAGAGATTTCTCTAAGTTAGGTGCAGGTTCTTGACCTACAATCTTAGTATCTT
 TTAATCATTTTTATGTATTGGAATTTGTTTTGTTGTCATGATTCTACAGCACCTACAGGTTTAAACA
 CCTAAAGATACAGCGCAGTGCAGTGGCACCTTGATATAGCGTAACAACAGCTTTGGTTTCCCTTTAATTT
 AGTTGTACCCATTGCATGTTAATTGAAGTTGTTTCTTATCTTTGTTATCAGATGATTGTTTATTGAAAT
 TCCCACTACATCTGCTAAAACAAGTAGGAAAGCAAGCGTAACAACAAGCATTTTAATTACTTTATTCAT
 (SEQ ID NO: 4)

C.

MNKVIKMLVVTLAFLLVLAGCSGNSNKSQSSDNKDKETTSIKHAMGTTEIKGKPKRVVTL
 YQGATDVAVSLGVKPVGAVESWTQKPKFEYIKNDLKD TKIVGQEPAPNLEEISKLPDL
 IVASKVRNEKVYDQLSKIAPTVSTDTVFKFKD TTKLMGKALGKEKEAEDLLKKYDDKVA
 AFQKDAKAKYKDAWPLKASVVNFRADHTRIYAGGYAGEILNDLGFKRNDLQKQVDNGK
 DIIQLTSKESIPLMNADHIFVVKSDPNKDAALVKKTESEWTSSKEWKNLDAVKNNQVS
 DDLDEITWNLAGGYKSSKLIDDLYEKLNIEKQSK (SEQ ID NO: 5)

Figura 8**A.**

1 atgctactta aacccaaaata ccaaatecgtt attgctgggt tatgtcttgc aatagtagct
 61 atcttaagtt taatgattgg aaatacgcct gtgtcaccag gtacgggtgat acaggcggtta
 121 ttcaactttg atagtgaata cgattttacat gatgttgtca ctgggtgcacg ggcgtcgaga
 181 acaatcattg cgttattgac tgggtgtgcc cttgctgtct caggtttgtt gatgcaagca
 241 cttacacgaa acccaatagc ctcaccaggg cttttcgggt tcaatgcagg cgcagtattt
 301 tttgtcattt ttagtattac atttatccaa attcaatctt ttaaaatgat tgtagttatt
 361 gcattttttg gggctattgt tgttactgta ttagttgttg cactagggtat gtttagacaa
 421 acactattct cacctcaccg tgtcattttg gcagggtgct cgattgcgat gctatttaca
 481 gcctttactc aaggcatact tattatgaac gaaacagact tacaaggcct attattttgg
 541 ttaagtggct cgttttcatt acgtaaatatt tgggatatcc catggattat tccgcttgta
 601 ttgatactta ttttaattgc atttagcatg gctgcacaca tcaacatctt gatgacaagt
 661 gacgacattg caaccggcct cggcctaaac ataaaattaa tcaaatggat gattattatg
 721 ctcatcagta tggtagccg tatttcggta gccgtagctg gatcaatcgt ctttgggggt
 781 cttatcgtac cgaatattag caaacgatta ttaccaccaa actataagta ttttaattcct
 841 tttactgcat tagctggagc aatcctaag atcatttcag acattgttgc tcgtataata
 901 attaagccac tagagttgcc tatcgggtgc gttaccgctg tcattggcgc tattgtctta
 961 atctatatta tgaagaaagg acgtcaacgc ttatga (SEQ ID NO: 6)

B.

tcataagcgttgacgtcctttcttcataatatagattaagacaatagcgccaatgacagcggtaacgacac
 cgataggcaactctagtggcttaattattatagagcaacaatgtctgaaatgacattaggattgctcca
 gctaattgcagtaaaaggaaattaaatacttatagtttgggtggaataatcgtttgctaataattcggtagat
 aagaccacaaaagacgattgatccagctacggctaccgaaataaccggctaacatactgatgagcataataa
 tcatccatttgattaattttatgttttgaccgaggccgggttgcaatgtcgtcacttgcacatcaagatgttg
 atgtgtgcagccatgctaaatgcaattaaaataagtatcaatacagcggaataatccatgggatatccca
 aatattacgtaatgaaacggagccacttaacccaaaataataggccttgtaagtctgtttcgttcataataa
 gtatgccttgagtaaaaggctgtaaatagcatcgcaatcgacgacacctgccccaaatgacacgggtgaggtgag
 aatagtgtttgtctaaacatacctagtgcacaactaatacagtaacaacaatagcccccaaaatgcaat
 aactacaatcattttaaaagattgaatttggataaatgtaataactaaaaatgacaaaaaatactgcgcctg
 cattgacaccgaaaagccctggtgaggctattgggtttcgtgtaagtgttgcatcaacaacacctgagaca
 gcaagggcagcaccagtcataaacgcaatgattgttctcgacgcccgtgcaccagtgacaacatcatgtaa
 atcgttttctactatcaaagttgaataacgcctgtatcacccgtacctggtgacacaagcgtatttccaatca
 ttaacttaagatagctactattgcaagacataaaccagcaataacgatttgggtattttgggttaagtagc
 at (SEQ ID NO: 7)

C.

MLLKPKYQIVIAGLCLAIVAILSLMIGNTLVSPGTVIQALFNFDSENDLHDVVTGARAS
 RTIIALLTGAALAVSGLLMQALTRNPIASPLFGVNAGAVFFVIFSITFIQIQSFKMIV
 VIAFLGAIVTVLVVALGMFRQTLFSPHRVILAGAAIAMLFTAFTQGILIMNETDLQGL
 LFWLSGSVSLRNIWDIPWIIPLVLILILIAFSMAAHINILMTSDDIATGLGQNIKLIKW
 MIIMLSMLAGISVAVAGSIVFVGLIVPNISKRLLPNYKYLIPTALAGAILMIISDI
 VARIIIKPLELPIGVVTAVIGAIVLIYIMKKGRQRL (SEQ ID NO: 8)

Figura 9**A.**

1 atgaccgaaa agattaataa aaaagacaat taccatctca tcttcgcggtt aatcttttta
 61 gccatcggtt cagtggtaag tatgatgatt ggttcaagct ttataccatt acaacgcgta
 121 ctgatgtact ttataaatcc aaatgacagt atggatcaat tcactttaga agtattacgc
 181 ttacctcgca ttacacttgc gatttttagca ggtgccgcac taggaatgag tggtttaatg
 241 ttgcaaaatg tattaataaaa tccaattgcc tcacctgata ttatcggtat cacagggtgt
 301 gctagcttaa gtgctgttgt ctttattgca tttttcagcc atttaacaat acatttactt
 361 ccactatttg cagtattagg tggcgcagtt gcaatgatga tactattagt gtttcaaacg
 421 aaaggacaaa tacgcccgcac aacactcata atcatcggtt tttcgatgca aacgttggtt
 481 attgcgcttg tccaaggatt actcattaca acgaagcaat tatctgctgc caaagcttat
 541 acatggctag tcggaagtct ttacggtgct acgttttaaag atacaatcat tttgggtatg
 601 gttatttttag ctggttggtcc gttgttattt cttgttatac caaaaatgaa aatatctata
 661 cttgatgacc ctgtagcgat tggcttaggc ttacatgtac aacgtatgaa actaatccaa
 721 ttaatcactt ctactatact cgtatctatg gcaatcagtt tagtaggtaa cattgggttt
 781 gtcggtttta tcgcaccaca tatcgcgaaa acaatcgttc gcggaagtta tgctaaaaag
 841 ttactaatgt cagcaatgat tgggtccata tcaattgtta ttgcagactt aattgggcgt
 901 accttattct tgcctaaaga agtgccagca ggtgtattta ttgctgcttt tgggtgcccc
 961 ttcttcatat acttattatt aaccgtgaaa aagttataa (SEQ ID NO: 9)

B.

ttataactttttcacgggttaataataagtatatgaagaatggggcaccaaaagcagcaataaatacacctg
 ctggcacttcttttaggcaagaataaggtagcggcaatgaagtgctgcaataacaattgatattggcaccatc
 attgctgacattagtaacttttagcataacttccgcgaacgattgttttcgcgatatgtggtgagattaa
 accgacaaacccaatgttacctactaaactgattgccatagatagcaggtatagtagaagtgattaatgga
 ttagtttcatacgttgtagatgtaagcctaagccaatcgctacaggggtcatcaagtatagatattttcatt
 tttggtataacaagaaataacaacggcacaacagctaaaataaccatacccaaatgattgtatctttaaa
 cgtagcaccgtaaaagacttccgactagccatgtataagctttggcagcagataaattgcttcgttgtaatga
 gtaatccttggaagcgcgaataaacaacggttgcatcgaaataaccgatgattatgagtggtgctgggcgt
 atttgctctttcgtttgaaacactaatagtatcatcattgcaactgcgccacctaatactgcaaatagtg
 aagtaaatgtattgttaaatggctgaaaaatgcaataaagacaacagcacttaagctagcaccacctgtga
 taccgataatatcaggtgaggcaattggattttttaatacattttgcaacattaaaccactcattcctagt
 gcggcacctgctaaaaatcgcaagtgaatgcgaggtgaagcgtaatacttctaaagtgaattgatccatact
 gtcatttggtattataaagtacatcagtagcggttgtaattggtataaagcttgaaaccaatcatcatactta
 ccactgaaacgatggctaaaaagattaacgcgaagatgagatggtaattgtcttttttattaatcttttcg
 gtcac (SEQ ID NO: 10)

C.

MTEKINKKDNHYHLIFALIFLAIVSVVSMIGSSFIPLQRVLMYFINPNDSDMQFTLEVL
 RLPRITLAILAGAALGMSGLMLQNVLKNPIASPDIIIGITGGASLSAVVFIAFFSHLTIH
 LLPLFAVLGGAVAMMILLVFQTKGQIRPTTLIIIGISMQTLFIALVQGLLITTKQLSAA
 KAYTWLVGSLYGATFKDTIILGMVILAVVPLFLVIPKMKISILDDPVAIGLGLHVQRM
 KLIQLITSTILVSMASLVGNIGFVGLIAPHIAKTIVRGSYAKLLMSAMIGAISIVIA
 DLIGRTLFLPKEVPAGVFIAAFGAPFFIYLLLTVKKL (SEQ ID NO: 11)

Figura 10**A.**

```

1 tttggatcca caagtttcaa aagcaaagcg attaatataa caaatcgata aagatgcatt
61 cctcgtaatt catgatgtaa gagatgtcta tggtaatggc tttcttgcag atgaataaat
121 aaatggatg agcacacata cttaaataga agtccacgga caagtttttg aactatgaag
181 acttatctgt gggcgttttt tttttataa agtaatatata caagacatga caaatcgagc
241 tatccaattt aaaaagtaat gttagtcaat aagattgaaa aatgttataa tgatgttcat
301 gataatcatt atcaattggg atgtctttga aaattgataa tttaaaaata gaaattattt
361 tttataaaca gaaagaattt tattgaaagt agggaaatta tgaatcgttt gcatggacaa
421 caagttaaaa ttggttacgg ggataacacg attataaata aattagatgt tgaaatacca
481 gatggcaaag tgacgtcaat cattggctct aacggctgcg ggaaatctac tttgctaaag
541 gcattgtcac gtttattggc agttaaagaa ggogaagtat ttttagatgg tgaaaatatt
601 catacacaat ctacgaaaga gattgcaaaa aaaatagcca ttttacctca atcacctgaa
661 gtagcagatg gcttaactgt tggggaatta gtttcatatg gtcgttttcc acatcaaaaa
721 ggatttggta gattaactgc tgaggataag aaagaaattg attgggcaat ggaagttaca
781 ggaactgata cattccgaca cgtttcaatc aatgatttaa gtggtggtca aagacaacgt
841 gtttggattg caatggcatt agcacaaga actgatatta tctttttaga cgaaccaaca
901 acatattttg atatctgtca tcaattagaa atactagaat tagttcagaa gctaaatcag
961 gaacaagggt gtacaattgt catggttctt catgatatca accaagcgat tcgtttctca
1021 gatcatctta ttgcgatgaa agaaggggat atcatcgcta caggttcaac agaagacgta
1081 ttaacacagg aaatattaga aaaagttttt aatattgatg ttgttttaag taaagatcct
1141 aaaactggaa aacctttact ggtaacttat gacttatgtc gcagagctta ttcttaatta
1201 agtaagttaa tatgataaaa aggacaatta acatgacaaa tagagagaac ccaacgccat
1261 tgaagttttt atcctatatt atagggttaa gtatgatact actaatcaca ctattttatt
1321 ctacattaat aggtgacgcc aaaattcaag cctctacaat tatagaggct atttttaatt
1381 ataactctag caatcaacag caaacatca tcaatgagat taggattccc agaaatatag
1441 cagcagtaat tgtagtgatg gcgcttgcat tttctggtgc gattatacaa ggtgttactc
1501 gtaatggtct tgctgatccg gcgctcatag gtttaaatc aggtgcttca tttgctttag
1561 cattaacata tgcagtttta ccaaacactt catttttaat attgatgttt gctggatttt
1621 taggtgctat tctaggagggt gctattgtat taatgatagg ccgatctaga cgtgatggat
1681 ttaatccgat gcgtattatt ttagcgggtg cagcagtaag tgctatgtta acagcgctaa
1741 gtcaaggat tgcattagct tttagactaa atcaaacagt aacatttttg actgctggag
1801 gcgtttcagg cacaacatgg tcacacctta agtgggcaat tccattaatt ggtattgcgt
1861 tattcattat attaacaatt agtaacaac ttaccatttt aaatcttggg gaatcattag
1921 ctaaaagggtt aggtcaaaat gtaacaatga tcagaggcat atgtttaatt attgctatga
1981 ttctagcagg tattgcagtt gctatcgctg gacaagttgc atttgtagggt ttgatggtag
2041 ctcatatagc aagattttta attggaactg attatgctaa aattctacca ttaacagcct
2101 tgtaggtgg gatactcgtg cttgttgccg atgtgatagc acgatattta ggagaagcgc
2161 ctgttggtgc aatcatttca tttatcggtg ttccttactt tttatattta gttaaaaaag
2221 gaggacgctc aatatgatta gttcaaataa taaacgcaga caattgatag cactggctgt
2281 ttttagcatt ctactatttc taggttgtag ttggagtatt acctcagggt aatacaacat
2341 acctgttgaa agatttttca aaactttaat tggacaagggt gatgccattg atgagttaat
2401 cttattagat ttcagggtac ctcggtgat gattactatt ttggctggcg cagcgcttag
2461 tattagtgg gcaatagtg aaagtgtcac aaaaaatcca atagctgaac caggtatatt
2521 aggtattaac gcagggtggcg gatttgcaat cgcattattt attgcaattg gtaaaattaa
2581 tgctgacaac tttgtttatg tactgcggtt aataagtata ctagggtgta tcaccactgc
2641 attgattatt tttattttca gttttaataa aaatgaagggt gttacacctg cgagtatggg
2701 attaatagggt gtaggtttac aaacagcatt atatgggtggc tcaattacaa ttatgtcaaa
2761 atttgatgat aagcaatctg atttcatcgc tgcttgggtt gcaggtaata tttgggggtga
2821 cgaatggcca tttgtcattg catttttacc gtgggtgttg attattattc cttacttact
2881 atttaaatcg aatacactaa atattattca tacgggtgat aatattgcac gaggtctagg
2941 tgtaagggtta agcagagaac gtttaatat attctttatc gcagtgatgt tatcatctgc

```

3001 tgctgtagca gtagcagggt caatttcggt tateggatta atgggtccgc atattgccaa
 3061 acgtatcggt ggaccacgtc accagttggt tttaccaatt gccatttttag taggggcatg
 3121 tttacttggt atagctgata caattggcaa aattgtatta caaccagggt ggggtccagc
 3181 aggtattgtc gtagcaatta ttggtgcacc gtatttctta tatttaattg acaaaacgaa
 3241 aaatgtatag tgtcaatgga cacaacttat tgctatgaaa ggcactttat tataaggctt
 3301 ttcatagcat tttttattta atgagccact caagactatt tttttttca ataatgaacc
 3361 attaagttat caagaggatc ttatcaaaaa tatatttgat aacgggatca ggtaattct
 3421 ttatgatagc gcattcattt attctgtttt atactatgac tgataatacc aaggaggtag
 3481 aacatgatga aaaagttaat caataaaaaa gaaacatttt taactgatat gcttgaagga
 3541 ttgttaattg cgcacccaga gttagatctg attgctaata cagttattgt aaaaaagct
 3601 aagaaagaac atggtgtagc aatagtctct ggaggtggaa gcggacatga acctgcgc
 3661 gccggttttg ttgcagaagg tatgctagat gcagcggttt gtggcgaagt atttacatcg
 3721 gatccaaa (SEQ ID NO: 12)

B.

tttggatccgatgtaaatacttcgccacaaaaccgctgcatctagcatatccttctgcaacaaaaccggcatg
 cgcagggttcaggtccgcttccacctccagagactattgctacaccatggtctttcttagctttttttacaa
 taactgtatttagcaatcagatctaactctgggtgcgcaattaacaatccttcaagcatatcagttaaaaat
 gtttcttttttattgattaaacttttcatcatggttgacctccttggtattatcagtcagatataaaaca
 gaataaatgaatgcgctatcataaagaattaacctgataccggttatcaaatatatttttgataagatcctc
 ttgataaacttaattggttcattatttgaaaaataaatagtccttgagtggtcattaaataaaaaatgctatg
 aaaagccttataataaagtgcctttcatagcaataagttgtgtccattgacactatacatttttctgttttg
 tacattaaatataagaataacgggtgcaccaataattgctacgacaatacctgctggaaccccacctgggtg
 taatacaattttgccaattgtatcagctataacaagtaaacatgcccactactaaaatggcaattggtaaaa
 acaactggtgacgtggtccaacgatacgtttggcaatatgcccacccattaatccgataaacgaaattgaa
 cctgctactgctacagcagcagatgataacatcactgcgataaagaataatattaaacgttctctgcttaa
 ccttacaccttagacctcgtgcaatattatcacccgtatgaataatatttagtgatttcgatttaaatagta
 agtaaggaataataatcaacacccacggtaaaaatgcaatgacaaatggccattcgtcaccccaaatatta
 cctgcaaaccaagcagcgatgaaatcagattgcttatcatcaaattttgacataattgtaattgagccacc
 atataatgctgtttgtaaacctacacctattaataccatactcgcagggtgtaaacaccttcatttttattaa
 aactgaaaataaaaaataatcaatgcagtggtgataccacctagtagtatacttattaacggcagtagcataaaca
 agttgtcagcattaattttaccatttgcaataaataatgagattgcaaatccgccacctgcttaataacc
 taataacctggttcagctattggattttttgtgacactttgcactattgcaccactaataactaagcgtg
 cgccagccaaaatagtaatacatcatccgaggttaacctgaaatctaataagattaaactcatcaatggcatca
 ccttgctcaattaaagttttgaaaaatctttcaacaggtatgttgatttcacctgaggttaactccaagt
 acaacctagaaatagtagaatgctaaaaacagccagtgctatcaattgtctgctgtttattatttgaaactaa
 tcatattgagcgtcctccttttttaactaaatataaaaaagtaaggaacaccgataaatgaaatgattgcac
 caacaggcgtctctcctaaatatcgtgctatcacatcggaacaagcagagtatcccacctaacagggt
 gttaatggtagaatttttagcataatcagttccaattaaaaatccttgctatatgaggtaccatcaaacctac
 aaatgcaacttgctccagcagatagcaactgcaatacctgctagaatcatagcaataattaaacatatgcctc
 tgatcattgttacattttgacctaaacctttagctaatgattcaccaagatttaaaatggtaagttgttta
 ctaattgttaataataatgaataacgcaataccaattaatggaattgccacttaaggtgtgacctggtgt
 gcctgaaacgcctccagcagtcctaaatggttactggtttgatttagtctaaaagctaatgcaataccttgac
 ttagcgtgttaacatagcacttactgctgcacccgctaaaataatagcatcggttaaatccatcacgt
 ctatagtcggcctatcattaataacaatagcacctcctagaatagcacctaaaaatccagcaaacatcaatat
 taaaaatgaagtgtttggtaaaactgcatatgttaatgctaaagcaaatgaagcacctgaatttaaaccta
 tgagcgccggatcagcaagaccattacagagtaaacaccttgataatcgccaccagaaactgcaagcgccata
 cctacaattactgctgctatatttctgggaatcctaatctcattgatgatgttttctgtgtgattgctagg
 attataattaaaaatagcctctataattgtagaggcttgaattttggcgctcacctattaatgtagaaataa
 atagtggtgattagtagtatcatacttaaacctataatataggataaaaaacttcaatggcggtgggttctct
 ctatttgcctatgttaattgtcctttttatcatattaacttacttaattaagaataagctctgcgacataag

tcataagttaccagtaaagggtttccagtttttaggatctttactttaaacaacatcaatattaaaaacttt
 ttctaataatttcctgtgttaatacgtcttctgttgaacctgtagcgatgatatcccccttctttcatcgcaa
 taagatgatctgagaaacgaatcgcttggttgatatcatgaagaacctgacaattgtacaaccttggtcc
 tgatttagcttctgaactaattctagtatttctaattgatgacagatatctaaatatgttggttggtcgtc
 taaaaagataatatcagttctttgtgctaattgccattgcaatccaaacacggtgtctttgaccaccactta
 aatcattgattgaacgggtgtcggaatgtatcagttcctgtaacttccattgcccaatcaatttctttctta
 tcctcagcagttaatctaccaaactctttttgatgtggaacgaccatatgaaactaattcccaacagt
 taagccatctgctacttcaggtgattgaggtaaaatggctattttttttgcaatctctttcgtagattgtg
 tatgaatattttcaccatctaaaaatacttcgccttctttaactgccaataaacgtgacaatgccttttagc
 aaagtagatttcccgagccggttaggaccaatgattgacgtcactttgccatctggtatttcaacatctaa
 tttatttataatcggtgttatccccgtaaccaattttaacttggtgtccatgcaaacgattcataatttccc
 tactttcaataaaaattctttctgtttataaaaaataatttctatttttaaattatcaattttcaaagacat
 cccaattgataatgattatcatgaacatcattataacatttttcaatcttattgactaacattacttttta
 aattggatagctcgattttgtcatgtcttgtatattacttttataaaaataaaaaacgcccacagataagtct
 tcatagttcaaaaacttgctcggtggacttctattttaagtatgtgtgctcataccattttatttattcatctg
 caagaaagccattaccatagacatctcttacatcatgaattacgaggaatgcattctttatcgatttggtta
 attaatcgcttttgcttttgaaacttggtgatccaaa (SEQ ID NO: 13)

Figura 11**A.**

1 atgaatcggt tgcattggaca acaagttaaa attgggttacg gggataaacac gattataaat
 61 aaatttagatg ttgaaatacc agatggcaaa gtgacgtcaa tcattgggtcc taacggctgc
 121 gggaaatcta ctttgctaaa ggcattgtca cgtttattgg cagttaaaga aggcgaagta
 181 ttttttagatg gtgaaaatat tcatacaciaa tctacgaaag agattgcaaa aaaaatagcc
 241 attttacctc aatcacctga agtagcagat ggcttaactg ttggggaatt agtttcatat
 301 ggtcgttttc cacatcaaaa aggatttggt agattaactg ctgaggataa gaaagaaatt
 361 gattgggcaa tggaagttac aggaactgat acattccgac accgttcaat caatgattta
 421 agtgggtggtc aaagacaacg tgtttggtt gcaatggcat tagcacaaaag aactgatatt
 481 atcttttttag acgaaccaac aacatattta gatattctgtc atcaattaga aatactagaa
 541 ttagttcaga agctaaatca ggaacaagggt tgtacaattg tcatggttct tcatgatatc
 601 aaccaagcga ttctgtttctc agatcatctt attgcatga aagaaggga tatcatcgct
 661 acaggttcaa cagaagacgt attaacacag gaaatattag aaaaagttt taatattgat
 721 gttgttttaa gtaaagatcc taaaactgga aaacctttac tggttaactta tgacttatgt
 781 cgcagagctt attcttaa (SEQ ID NO: 14)

B.

ttaagaataagctctgcgacataagtcataagttaccagtaaagggtttccagtttttaggatctttactta
 aaacaacatcaatattaaaaactttttctaatatttctgtgttaatacgtcttctgttgaaacctgtagcg
 atgatatccccttctttcatcgcaataagatgatctgagaaacgaatcgcttggttgatatcatgaagaac
 catgacaattgtacaacctgttctctgatttagcttctgaactaattctagtatttctaatgtatgacaga
 tatctaaatatgttggttggttctgtctaaaaagataatatcagttctttgtgctaattgccattgcaatcaa
 acacgttgcttttgaccaccacttaaatcattgattgaacggtgtcggaatgtatcagttcctgttaacttc
 cattgccccaatcaatttctttcttatctcagcagttaatctaccaaactctttttgatgtggaaaacgac
 catatgaaactaattccccaacagtttaagccatctgctacttcaggtgattgaggtaaaatggctattttt
 tttgcaatctctttctgtagattgtgtatgaatattttcaccatctaaaaatacttcgccttctttaactgc
 caataaacgtgacaatgccttttagcaaagtagatttcccgagccgtaggaccaatgattgacgtcactt
 tgccatctggtatttcaacatctaatttatttataatcgtgttatccccgtaaccaattttaacttggtgt
 ccatgcaaacgattcat (SEQ ID NO: 15)

C.

MNRLHGQQVKIGYGDNTIINKLDVEIPDGKVTSIIGPNGCGKSTLLKALSRLAVKEGE
 VFLDGENIHTQSTKEIAKKIAILPQSPEVADGLTVGELVSYGRFPHQKGFRLTAEDKK
 EIDWAMEVTGTDTRHRSINDLSGGQRQRVWIAMALAQRDIIIFLDEPTTYLDICHQLE
 ILELVQKLNQEQGCTIVMLHDINQAIRFSDHLIAMKEGDIIATGSTEDVLTQEILEKV
 FNIDVVLKDPKTGKPLLVTYDLCRRAYS (SEQ ID NO: 16)

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 02094868 A [0003]
- WO 9947662 A [0004]
- WO 9007861 A [0018]
- EP 0451216 A [0018]
- US 6468532 B [0019] [0149]
- EP 0259149 A [0061]
- US 5176996 A [0067]
- US 5264564 A [0067]
- US 5256775 A [0067]
- WO 9317117 A [0083]
- WO 9714806 A [0083]
- US 20020182223 A [0089]
- US 20030027783 A [0089]
- WO 0136646 A [0089]
- WO 03006477 A [0089]
- WO 9954459 A, Thompson [0091]
- US 6001311 A, Brennan [0091]
- WO 9323569 A, Draper [0093]
- US 5093246 A [0094]
- US 5254678 A [0094]
- US 5144019 A [0094]
- US 5116742 A [0094]
- US 5225337 A [0094]
- US 6184344 B [0103]
- US 6174530 B [0103]
- US 5270181 A [0105]
- US 5292646 A [0105]
- WO 9402502 A [0105]
- US 5223409 A [0113]
- US 5198346 A [0113]
- US 5096815 A [0113]
- WO 8806630 A, Ladner [0116]
- WO 9002909 A, Ladner [0117]
- WO 9209690 A, Garrard [0117]
- US 4522752 A, Sisto [0126]
- WO 0001720 A [0126] [0128] [0129]
- WO 9321319 A [0145]
- EP 239400 A [0145]
- WO 8909622 A [0145]
- EP 388745 A [0145]
- EP 332424 A [0145]
- US 4683195 A, Mullis [0246]

10 Literatura no patente citada en la descripción

- ARCHER. *Clin. Infect. Dis.*, 1998, vol. 26, 1179-1181 [0001]
- KOHLER; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-497 [0016]
- KOZBOR et al. *Immunol. Today*, 1983, vol. 4, 72 [0016]
- COLE et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, Inc, 1985, 77-96 [0016]
- KABAT et al. *Sequences of Proteins of Immunologic Interest*. US Dept. Health and Human Services, 1987 [0018]
- KOSTELNEY et al. *J. Immunol*, 1992, vol. 148, 1547-1553 [0019]
- *Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis*. Methods in Enzymology. Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co, 1996, vol. 266 [0024]
- *Meth. Mol. Biol.*, 1997, vol. 70, 173-187 [0024]
- *Methods in Enzymology* [0024]
- HEINRICHS et al. *J. Bacteriol.*, 1999, vol. 181, 1436-1443 [0031] [0207] [0235]
- DAVIS et al. *Basic Methods In Molecular Biology*, 1986 [0057]
- EVANS et al. *Nature*, 1989, vol. 339, 385 [0061]
- HUANG et al. *J. Virol.*, 1988, vol. 62, 3855 [0061]
- SCHLIENGER et al. *J. Virol.*, 1992, vol. 66, 2 [0061]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1991 [0062]
- HOCHULI et al. *J. Chromatography*, 1987, vol. 411, 177 [0062]
- JANKNECHT et al. *PNAS USA*, vol. 88, 8972 [0062]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1992 [0063]
- VAN DER KROL et al. *Biotechniques*, 1988, vol. 6, 958-976 [0067]
- STEIN et al. *Cancer Res*, 1988, vol. 48, 2659-2668 [0067]
- ELBASHIR et al. *Nature*, 2001, vol. 411 (6836), 494-8 [0068]
- LEE et al. *Nature Biotech*, 2002, vol. 19, 500 [0073]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989 [0080]
- *DNA Cloning*. 1985, vol. I and II [0080] [0246]
- *Oligonucleotide Synthesis*. 1984 [0080] [0246]
- *Nucleic Acid Hybridisation*. 1984 [0080]
- *Transcription and Translation*. 1984 [0080]
- *Animal Cell Culture*. 1986 [0080]

- Immobilised Cells and Enzymes. IRL Press, 1986 [0080]
- B. PERBAL. *A Practical Guide to Molecular Cloning*, 1984 [0080]
- Methods in Enzymology. Academic Press, Inc, [0080]
- Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells. Cold Spring Harbor Laboratory, 1987 [0080]
- Methods in Enzymology. vol. 154-155 [0080]
- Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology. Academic Press, 1987 [0080]
- SCOPES. Protein Purification: Principles and Practice. Springer-Verlag, N.Y, 1987 [0080]
- Handbook of Experimental Immunology. 1986, vol. I-IV [0080]
- ASHER et al. *Nature*, 1969, vol. 223, 715-717 [0083]
- ZERNICKA-GOETZ et al. *Development*, 1997, vol. 124, 1133-1137 [0084]
- WIANNY et al. *Chromosoma*, 1998, vol. 107, 430-439 [0084]
- PAUL et al. *Nature Biotechnology*, 2002, vol. 29, 505 [0089]
- XIA et al. *Nature Biotechnology*, 2002, vol. 20, 1006 [0089]
- ZENG et al. *Mol. Cell*, 2002, vol. 9, 1327 [0089]
- THIJN et al. *Science*, 2002, vol. 296, 550 [0089]
- *BMC Biotechnol.*, 28 August 2002, vol. 2 (1), 15 [0089]
- LEE et al. *Nature Biotechnology*, 2002, vol. 19, 500 [0089]
- MCMANUS et al. *RNA*, 2002, vol. 8, 842 [0089]
- MIYAGISHI et al. *Nature Biotechnology*, 2002, vol. 19, 497 [0089]
- SUI et al. *PNAS*, 2002, vol. 99, 5515 [0089]
- YU et al. *PNAS*, 2002, vol. 99, 6047 [0089]
- SHI et al. *Trends Genet.*, 2003, vol. 19 (1), 9 [0089]
- GAUDILLIERE et al. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277 (48), 46442 [0089]
- CARUTHERS et al. *Methods in Enzymology*, 1992, vol. 211, 3-19 [0091]
- WINCOTT et al. *Nucl. Acids Res.*, 1995, vol. 23, 2677-2684 [0091]
- WINCOTT et al. *Methods Mol. Bio.*, 1997, vol. 74, 59 [0091] [0092]
- BRENNAN et al. *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, vol. 61, 33-45 [0091]
- USMAN et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, vol. 109, 7845 [0092]
- SCARINGE et al. *Nucl. Acids Res.*, 1990, vol. 18, 5433 [0092]
- WINCOTT et al. *Nucl. Acids Res.*, 1990, vol. 23, 2677-2684 [0092]
- MOORE et al. *Science*, 1992, vol. 256, 9923 [0093]
- SHABAROVA et al. *Nucl. Acids Res.*, 1991, vol. 19, 4247 [0093]
- BELLON et al. *Nucleosides & Nucleotides*, 1997, vol. 16, 951 [0093]
- BELLON et al. *Bioconjugate Chem*, 1997, vol. 8, 204 [0093]
- SARVER et al. *Science*, 1990, vol. 247, 1222-1225 [0094]
- USMAN et al. *Current Opin. Struct. Biol.*, 1996, vol. 6, 527-533 [0094]
- LONG et al. *FASEB J*, 1993, vol. 7, 25 [0094]
- SYMONS. *Ann. Rev. Biochem.*, 1992, vol. 61, 641 [0094]
- PERROTTA et al. *Biochem.*, 1992, vol. 31, 16-17 [0094]
- OJWANG et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1992, vol. 89, 10802-10806 [0094]
- KOIZUMI et al. *Nucleic Acid Res.*, 1989, vol. 17, 7059-7071 [0094]
- KOIZUMI et al. *Nucleic Acids Res.*, 1989, vol. 17, 7059-7071 [0094]
- CHOWRIRA ; BURKE. *Nucleic Acids Res.*, 1992, vol. 20, 2835 [0094]
- DAUBENDIEK ; KOOL. *Nat. Biotechnol.*, 1997, vol. 15 (3), 273-277 [0094]
- GENERALLY ; HELENE. *Anticancer Drug Des.*, 1991, vol. 6 (6), 569-84 [0095]
- HELENE et al. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, vol. 660, 27-36 [0095]
- MAHER. *Bioassays*, 1992, vol. 14 (12), 807-15 [0095]
- GOOD et al. *Gene Therapy*, 1997, vol. 4, 45-54 [0096]
- MUIR et al. *Curr. Opin. Biotech.*, 1993, vol. 4, 420 [0103]
- MILLER et al. *Science*, 1989, vol. 246, 1149 [0103]
- WLODAWER et al. *Science*, 1989, vol. 245, 616 [0103]
- HUANG et al. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 7402 [0103]
- SCHNOLZER et al. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1992, vol. 40, 180-193 [0103]
- RAJARATHNAM et al. *Science*, 1994, vol. 264, 90 [0103]
- Chemical Approaches to Protein Engineering. R. E. OFFORD. Protein Design and the Development of New therapeutics and Vaccines. Plenum Press, 1990, 253-282 [0103]
- WALLACE et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 3852 [0103]
- ABRAHMSSEN et al. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 4151 [0103]
- CHANG et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 12544-12548 [0103]
- SCHNOLZER et al. *Science*. 1992, vol. 3256, 221 [0103]
- AKAJI et al. *Chem, Pharm. Bull.*, 1985, vol. 33, 184 [0103]
- NARANG. *Tetrahedron*, 1983, vol. 39, 3 [0113]
- Recombinant DNA, Proc. ITAKURA et al. 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules. Elsevier, 1981, 273-289 [0113]

- ITAKURA et al. *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, vol. 53, 323 [0113]
- ITAKURA et al. *Science*, 1984, vol. 198, 1056 [0113]
- IKE et al. *Nucleic Acid Res.*, 1983, vol. 11, 477 [0113]
- SCOTT et al. *Science*, 1990, vol. 249, 386-390 [0113]
- ROBERTS et al. *PNAS USA*, 1992, vol. 89, 2429-2433 [0113]
- DEVLIN et al. *Science*, 1990, vol. 249, 404-406 [0113]
- CWIRLA et al. *PNAS USA*, 1990, vol. 87, 6378-6382 [0113]
- RUF et al. *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 1565-1572 [0114]
- WANG et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 3095-3099 [0114]
- BALINT et al. *Gene*, 1993, vol. 137, 109-118 [0114]
- GRODBERG et al. *Eur. J. Biochem.*, 1993, vol. 218, 597-601 [0114]
- NAGASHIMA et al. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, 2888-2892 [0114]
- LOWMAN et al. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 10832-10838 [0114]
- CUNNINGHAM et al. *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0114]
- GUSTIN et al. *Virology*, 1993, vol. 193, 653-660 [0114]
- BROWN et al. *Mol. Cell Biol.*, 1992, vol. 12, 2644-2652 [0114]
- MCKNIGHT et al. *Science*, 1982, vol. 232, 316 [0114]
- MEYERS et al. *Science*, 1986, vol. 232, 613 [0114]
- LEUNG et al. *Method Cell Mol Biol*, 1989, vol. 1, 11-19 [0114]
- MILLER et al. *A Short Course in Bacterial Genetics*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, 1992 [0114]
- GREENER et al. *Strategies in Mol Biol*, 1994, vol. 7, 32-34 [0114]
- FUCHS et al. *Biol Technology*, 1991, vol. 9, 370-1371 [0116]
- GOWARD et al. *TIBS*, 1992, vol. 18, 136-140 [0116]
- MARKS et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 16007-16010 [0117]
- GRIFFITHS et al. *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0117]
- CLACKSON et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0117]
- BARBAS et al. *PNAS USA*, 1992, vol. 89, 4457-4461 [0117]
- FREIDINGER et al. *Peptides: Chemistry and Biology*. ESCOM Publisher, 1988 [0120]
- HUFFMAN et al. *Peptides: Chemistry and Biology*. ESCOM Publisher, 1988 [0120]
- GARVEY et al. *Peptides: Chemistry and Biology*. ESCOM Publisher, 1988 [0120]
- EWENSON et al. *J. Med. Chem.*, 1986, vol. 29, 295 [0120]
- *Peptides: Structure and Function*. EWENSON et al. Proceedings of the 9th American Peptide Symposium. Pierce Chemical Co, 1985 [0120]
- NAGAI et al. *Tetrahedron Lett*, 1985, vol. 26, 647 [0120]
- SATO et al. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1986, vol. 1, 1231 [0120]
- GORDON et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, vol. 126, 419 [0120]
- DANN et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986, vol. 134, 71 [0120]
- Y.K. SHUE et al. *Tetrahedron Letters*, 1987, vol. 28, 3225 [0129]
- LOOTS et al. *Peptides: Chemistry and Biology*. Escom Science Publishers, 1988, 118 [0130]
- *Peptides: Structure and Function*. PETRILLO et al. Proceedings of the 9th American Peptide Symposium. Pierce Chemical Co, 1985 [0130]
- KIM et al. *J. Org. Chem.*, 1997, vol. 62, 2847 [0131]
- XI et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, vol. 120, 80 [0131]
- WILLIAMS et al. *J. Med. Chem.*, 1996, vol. 39, 1345-1348 [0131]
- *Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*. 1985 [0142]
- KOHLER ; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495-7 [0143]
- *Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas*. CAMPBELL ; BURDON et al. Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier Science Publishers, 1985, vol. 13 [0143]
- HUSE et al. *Science*, 1989, vol. 246, 1275-81 [0143]
- HARLOW ; LANE. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 [0144]
- PEARSON ; LIPMAN. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, vol. 85, 2444-8 [0146]
- HABIG et al. *J. Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, 7130 [0178]
- COX. *Meth. Enzymol.*, 1994, vol. 235, 315 [0181]
- CHOMCZYNSKI et al. *Anal. Biochem.*, 1987, vol. 162, 156-159 [0184]
- HARADA et al. *Cell*, 1990, vol. 63, 303-312 [0185]
- MAKINO et al. *Technique*, 1990, vol. 2, 295-301 [0186]
- *PCR Primer: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab Press, 1995 [0186]
- SEBULSKY et al. *J. Bacteriol.*, 2000, vol. 182, 4394-4400 [0193] [0198] [0201] [0211] [0223] [0225] [0231] [0233] [0234] [0235] [0246]
- DALE et al. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, 29-37 [0201] [0203] [0204] [0207] [0215] [0217] [0239] [0246]
- VAGNER et al. *Microbiology*, 1998, vol. 144, 3097-3104 [0203]
- YEOWELL et al. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1982, vol. 22, 961-968 [0211]
- SEBULSKY ; HEINRICHS. *J. Bacteriol.*, 2001, vol. 183, 4394-4400 [0216]

- SEBULSKY et al. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, 49890-900 [0216] [0246]
- SEBULSKY et al. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, 53152-9 [0218] [0231] [0240]
- SAMBROOK et al. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0219]
- DALE et al. *J. Bacteriol.*, 2004, vol. 186, 8356-62 [0224] [0228] [0235] [0237]
- XIONG et al. *Microbiology*, 2000, vol. 146, 659-668 [0231]
- CABRERA et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, vol. 67, 1001-3 [0231] [0233] [0234]
- Detection, isolation, and characterization of siderophores. PAYNE. *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc, 1994, vol. 235, 329-344 [0233]
- HOLLAND ; BLIGHT. *J. Mol. Biol.*, 1999, vol. 293, 381-99 [0235]
- MACK et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 320, 781-8 [0238]
- MAZMANIAN et al. *Science*, 2003, vol. 299, 906-9 [0238]
- SKAAR ; SCHNEEWIND. *Microbes Infect.*, 2004, vol. 6, 390-7 [0238]
- *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0246]
- *Nucleic Acid Hybridization*. 1984 [0246]
- *Transcription And Translation*. 1984 [0246]
- *Culture Of Animal Cells*. R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc, 1987 [0246]
- *Immobilized Cells And Enzymes*. IRL Press, 1986 [0246]
- B. PERBAL. *A Practical Guide To Molecular Cloning*, 1984 [0246]
- *Methods In Enzymology*. Academic Press, Inc, [0246]
- *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1987 [0246]
- *Methods In Enzymology* [0246]
- *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology*. Academic Press, 1987 [0246]
- *Handbook Of Experimental Immunology*. 1986, vol. I-IV [0246]
- *Antibodies: A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture*. 1987 [0246]
- *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986 [0246]
- CHAKRABORTY et al. *J. Bacteriol.*, 1992, vol. 174, 568-574 [0246]
- GUEROUT-FLEURY et al. *Gene*, 1995, vol. 167, 335-336 [0246]
- VAGUER et al. *Microbiology*, 1998, vol. 144, 3097-3104 [0246]
- KREISWIRTH et al. *Nature*, 1983, vol. 305, 680-685 [0246]
- PENG et al. *J. Bacteriol.*, 1988, vol. 170, 4365-4372 [0246]
- DUTHIE ; LORENZ. *J. Gen. Microbiol.*, 1952, vol. 6, 95-107 [0246]
- SEBUSKLY et al. *J. Bacteriol.*, 2000, vol. 182, 4394-4400 [0246]
- SEBUSKLY ; HEINRICHS. *J. Bacteriol.*, 2001, vol. 183, 4994-5000 [0246]
- LEE. *Mol. Microbiol.*, 1992, vol. 6, 1515-1522 [0246]
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0246]