

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2002.01.28	(73) Titular(es): INHIBITEX INC. 8995 WESTSIDE PARKWAY ALPHARETTA, GA 30004 US
(30) Prioridade(s): 2001.01.26 US 264072 P 2001.03.12 US 274611 P 2001.06.18 US 298413 P 2001.07.30 US 308116 P	(72) Inventor(es): JOSEPH M. PATTI US JEFF T. HUTCHINS US PAUL DOMANSKI US PRATISKSHA PATEL US ANDREA HALL US
(43) Data de publicação do pedido: 2004.01.07	
(45) Data e BPI da concessão: 2011.09.14 001/2012	(74) Mandatário: ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA A PROTEÍNA CLFA E MÉTODO DE UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE INFECÇÕES**

(57) Resumo:

SÃO PROPORCIONADOS ANTICORPOS MONOCLONAIS QUE SE PODEM LIGAR À PROTEÍNA CLFA E QUE SÃO GERADOS A PARTIR DE SUBDOMÍNIOS DE LIGAÇÃO OU FRAGMENTOS ACTIVOS DA PROTEÍNA CLFA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS, INCLUINDO OS FRAGMENTOS ACTIVOS OU PROTEÍNAS A PARTIR DO SEU DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DE FIBRINOGENIO TAIS COMO A PROTEÍNA CLF40, A PROTEÍNA CLF33, OU CLFA N3, QUE PODEM SER ÚTEIS NO TRATAMENTO E PROTECÇÃO CONTRA INFECÇÃO POR BACTÉRIAS ESTAFILOCÓCICAS TAIS COMO STAPHYLOCOCCUS AUREUS. ADICIONALMENTE, INSTRUMENTOS MÉDICOS PODEM SER TRATADOS UTILIZANDO OS ANTICORPOS MONOCLONAIS DO INVENTO DE MODO A REDUZIR OU ELIMINAR A POSSIBILIDADE DE FICAREM INFECTADOS OU DE ESPALHAR ADICIONALMENTE A INFECÇÃO. EM PARTICULAR, OS ANTICORPOS DO PRESENTE INVENTO SÃO VANTAJOSOS PORQUE PODEM IMPEDIR A ADESÃO DAS BACTÉRIAS A CÉLULAS HOSPEDEIROS DIFICULTANDO OU INIBINDO A CAPACIDADE DE CLFA DE S. AUREUS PARA SE LIGAR A FIBRINOGENIO OU FIBRINA, E ASSIM PODEM SER UTILIZADOS EM MÉTODOS DE TRATAMENTO OU PREVENÇÃO DE INFECÇÕES ESTAFILOCÓCICAS.

RESUMO**"Anticorpos monoclonais para a proteína ClfA e método de utilização no tratamento ou prevenção de infecções"**

São proporcionados anticorpos monoclonais que se podem ligar à proteína ClfA e que são gerados a partir de subdomínios de ligação ou fragmentos activos da proteína ClfA de *Staphylococcus aureus*, incluindo os fragmentos activos ou proteínas a partir do seu domínio de ligação de fibrinogénio tais como a proteína Clf40, a proteína Clf33, ou ClfA N3, que podem ser úteis no tratamento e protecção contra infecção por bactérias estafilocócicas tais como *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, instrumentos médicos podem ser tratados utilizando os anticorpos monoclonais do invento de modo a reduzir ou eliminar a possibilidade de ficarem infectados ou de espalhar adicionalmente a infecção. Em particular, os anticorpos do presente invento são vantajosos porque podem impedir a adesão das bactérias a células hospedeiras dificultando ou inibindo a capacidade de ClfA de *S. aureus* para se ligar a fibrinogénio ou fibrina, e assim podem ser utilizados em métodos de tratamento ou prevenção de infecções estafilocócicas.

DESCRIÇÃO

"Anticorpos monoclonais para a proteína ClfA e método de utilização no tratamento ou prevenção de infecções"

Campo do invento

O presente invento refere-se em geral a anticorpos que foram gerados contra factor de agregação (*clumping*) A (ou ClfA), uma proteína localizada à superfície expressa em *Staphylococcus aureus* e noutras bactérias estafilocócicas, e em particular a um anticorpo monoclonal contra a proteína ClfA e seus fragmentos activos ou proteínas a partir do seu domínio de ligação de fibrinogénio tais como Clf33, e à sua utilização na inibição da ligação da proteína ClfA a fibrinogénio ou fibrina e no tratamento ou prevenção de infecções por *S. aureus*.

Antecedentes do invento

A colonização bem sucedida do hospedeiro é um processo requerido para a maioria dos microrganismos causar infecções em animais e humanos. A adesão microbiana é o primeiro passo crucial numa série de eventos que podem conduzir eventualmente à doença. Os microrganismos patogénicos colonizam o hospedeiro ligando-se a tecidos do hospedeiro ou a biomateriais implantados condicionados em soro, tais como cateteres, articulações artificiais e enxertos vasculares, através de adesinas específicas presentes sobre a superfície das bactérias. As MSCRAM™ (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) são uma família de adesinas de superfície celular que reconhecem e especificamente se ligam a componentes distintos na matriz extracelular do hospedeiro. Após as bactérias terem aderido com sucesso e colonizado tecidos do hospedeiro, a sua fisiologia é dramaticamente alterada e são segregados componentes danificadores tais como toxinas e enzimas proteolíticas. Para além disso, bactérias aderentes produzem frequentemente um biofilme e tornam-se rapidamente mais resistentes ao efeito de morte da maioria dos antibióticos.

O *S. aureus* causa um espectro de infecções que vão desde lesões cutâneas, tais como infecções em feridas, impetigo e furúnculos, até condições com ameaça para a vida que incluem pneumonia, artrite séptica, sepsia, endocardite e infecções relacionadas com biomateriais. O *S. aureus* é conhecido por expressar um repertório de diferentes MSCRAMM que podem actuar individualmente ou de modo concertado para facilitar a adesão microbiana a componentes específicos de tecido do hospedeiro. As MSCRAMM proporcionam um excelente alvo para ataque imunológico por anticorpos, em particular anticorpos monoclonais. A presença dos anticorpos apropriados anti-MSCRAMM de elevada afinidade pode ter um ataque em duas frentes, em primeiro lugar os anticorpos podem impedir a adesão microbiana e em segundo lugar os níveis aumentados de anticorpos de MSCRAMM facilitam uma rápida depuração do organismo a partir do corpo através de morte opsonofagocítica.

No entanto, tem ainda subsistido um problema em identificar e utilizar a informação referente a MSCRAMM™ de *S. aureus*, tais como a proteína ClfA, para gerar anticorpos monoclonais eficazes, por causa da variabilidade nas propriedades de ligação das diferentes MSCRAMM™ e do seu papel na infectividade e no espalhar de infecções bacterianas. Em particular, tem sido um problema desenvolver anticorpos monoclonais que se possam ligar a ClfA e que possam ser utilizados para inibir ou dificultar a ligação de ClfA estafilocócica a fibrinogénio ou fibrina, e assim ser úteis em métodos de prevenção ou tratamento de infecções estafilocócicas. Tem assim subsistido um objectivo altamente desejável no campo das doenças infecciosas em desenvolver anticorpos monoclonais e outras composições que sejam bem sucedidos no tratamento e prevenção de uma ampla variedade de infecções estafilocócicas, particularmente por inibição ou dificuldade da capacidade das bactérias em se ligarem a fibrinogénio ou fibrina.

A WO 00/64925 revela a utilização de anticorpos baseados nas regiões Clf40 e Clf41 de ClfA no tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias estafilocócicas.

A US 6008341 descreve o isolamento da proteína de ligação a fibrinogénio de *S. aureus* e sua utilização na criação de anticorpos.

O'Connell *et al.* (J. Biol. Chem. Vol. 273, N.º 12, págs. 6821-6898; 1998) investigam a proteína ClfA de *S. aureus* e demonstram que a região A de ClfA se pode ligar a Ca^{2+} e que a interacção entre a região A de ClfA e fibrinogénio é inibida por concentrações milimolares de Ca^{2+} .

Hartford *et al.* (Molecular Microbiol. (1997) 25(6), 1065-1076) estudam outra vez a proteína ClfA de *S. aureus* e em particular se a região R tem ou não um papel na exibição à superfície do domínio A da região de ligação a fibrinogénio.

Hartford *et al.* (J. Biol. Chem. Vol. 276, N.º 4, págs. 2466-2473; 2001) descrevem também o estudo de proteína ClfA de *S. aureus* e em particular a sua ligação a fibrinogénio. Os autores descrevem anticorpos policlonais criados contra um truncado de ClfA recombinante, composto de resíduos 5000-559 da região A. Verificaram que estes anticorpos foram capazes de bloquear a interacção entre *S. aureus* e fibrinogénio.

Sumário do invento

Por conseguinte, é um objectivo do presente invento proporcionar um anticorpo monoclonal que se pode ligar à proteína do subdomínio Clf33 da proteína de ClfA de *S. aureus* e assim ser útil em métodos para tratar ou prevenir infecções estafilocócicas. O anticorpo monoclonal é o anticorpo monoclonal 12-9 possuindo

(i) uma sequência leve variável codificada por uma sequência de ácido nucleico seleccionada entre o grupo consistindo de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:17 e seus degenerados; e

(ii) uma cadeia pesada variável codificada por uma sequência de ácido nucleico seleccionada entre o grupo consistindo de SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 19 e seus degenerados.

É também um objectivo do presente invento proporcionar um anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar a ClfA, e que

é gerado a partir do subdomínio de ligação da proteína ClfA de *S. aureus*, Clf33, ou suas porções activas, para ser utilizado em métodos de tratamento ou protecção contra infecções estafilocócicas.

É também um objectivo do presente invento proporcionar um anticorpo monoclonal para a proteína Clf33 que pode ser útil em impedir a adesão de bactérias estafilocócicas por inibição ou dificuldade da ligação da proteína ClfA a fibrinogénio ou fibrina.

É um objectivo adicional do invento proporcionar sequências de aminoácidos e as sequências de ácido nucleico que codificam a sequência leve variável e as sequências pesadas variáveis do anticorpo monoclonal do presente invento.

É ainda um objectivo adicional do presente invento proporcionar um anticorpo monoclonal 12-9 para o subdomínio Clf33 de ClfA que é protector contra infecção por *S. aureus*, e que pode conseguir reactividade cruzada contra outros tipos de infecção estafilocócica.

Estes e outros objectivos são proporcionados em virtude do presente invento que compreende o isolamento e utilização de anticorpo monoclonal 12-9 para o subdomínio de ligação Clf33 da proteína ClfA para a prevenção e tratamento de infecções por *Staphylococcus*. O presente pedido de patente descreve assim a identificação, produção, caracterização e avaliação *in vivo* de um anticorpo monoclonal 12-9 contra Clf33 de ClfA, uma proteína localizada à superfície expressa por virtualmente cada uma das estirpes de *S. aureus*. Os dados aqui apresentados demonstram claramente que o anticorpo monoclonal 12-9 contra os subdomínios activos de ClfA tais como Clf33 pode ser utilizado para tratar ou proteger contra infecções por *S. aureus*.

A identificação e isolamento de anticorpos monoclonais anti-ClfA de acordo com o presente invento pode assim ser utilizada para dificultar ou inibir a ligação da proteína ClfA a fibrinogénio ou fibrina e assim ser útil em métodos de tratamento ou prevenção de infecções estafilocócicas. São

também descritas composições e vacinas adequadas baseadas nos subdomínios de proteína ClfA isolados e anticorpos criados contra estes, bem como métodos para a sua utilização.

Estas concretizações e outras alternativas e modificações dentro do âmbito do invento revelado tornar-se-ão prontamente evidentes para os peritos na especialidade da leitura do presente fascículo e/ou das referências aqui citadas.

Breve descrição das figuras

A Figura 1 é um gráfico de uma análise Biacore utilizada para medir a ligação de ClfA e a ligação/inibição subsequente de fibrinogénio quando anticorpos monoclonais 13-1 ou 13-2 de acordo com o presente invento estão ligados a um *chip* utilizando anticorpo Fc de coelho anti-ratinho (RAM-Fc).

A Figura 2 é um gráfico de uma análise Biacore do anticorpo monoclonal 12-9 quimérico de acordo com o presente invento.

A Figura 3 é um gráfico de uma análise de citometria de fluxo de anticorpo monoclonal 12-9 quimérico mostrando a ligação a *S. aureus* (estirpe Newman).

A Figura 4 é um gráfico mostrando a afinidade de ligação a ClfA de anticorpo monoclonal 12-9 quimérico e humanizado de acordo com o invento.

A Figura 5 é um gráfico mostrando a protecção contra *Staphylococcus aureus* num modelo murino de desafio letal.

A Figura 6 é um gráfico mostrando a inibição de células inteiras da adesão de *S. aureus* a fibrinogénio imobilizado utilizando os anticorpos monoclonais do presente invento.

A Figura 7 é um gráfico mostrando a ligação comparativa de *S. aureus* utilizando os anticorpos monoclonais 12-9 murino, 12-9 quimérico e 12-9 humanizado de acordo com o presente invento.

A Figura 8 é uma ilustração das sequências de cadeia pesada variável e leve variável dos anticorpos monoclonais do presente invento mostrando as sequências conservadas nas regiões CDR1, CDR2 e CDR3.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

De acordo com o presente invento, é proporcionado um anticorpo monoclonal 12-9, que se pode ligar à proteína ClfA de *S. aureus*, e este anticorpo monoclonal foi criado contra proteína de subdomínio de ligação activa Clf33 que foi isolada e purificada pelos presentes inventores. Foi mostrado que o anticorpo monoclonal 12-9 de acordo com o invento trata ou protege contra infecções por *S. aureus*.

Anteriormente, McDevitt *et al.* (McDevitt *et al.*, 1994, Mol. Microbiol. 11, 237-248) identificaram uma proteína de superfície de 92 kDa, a partir de *S. aureus* da estirpe Newman, que se demonstrou ser responsável pela agregação de bactérias dependente de fibrinogénio, e esta é agora revelada na Patente dos E.U.A. N.º 6177084. O gene, designado *ClfA*, foi clonado e sequenciado, e este é revelado na Patente dos E.U.A. N.º 6008341, e esta região, representando uma proteína de 896 aminoácidos conforme prevista a partir da sequência de ADN, medeia a adesão de bactérias a superfícies revestidas com fibrinogénio, identificando desse modo ClfA como uma MSCRAMM™. O gene *ClfA* consiste de um domínio citoplásmico, um domínio transmembrana, um domínio de ancoragem à parede celular e uma região (designada por R) que liga os domínios de ancoragem da célula à região A NH₂-terminal (composta de um segmento único de 520 resíduos). O domínio de ligação a fibrinogénio desta MSCRAMM foi localizado num segmento de 218 resíduos dentro da região A. McDevitt *et al.* (McDevitt *et al.*, 1995, Mol. Microbiol. 16, 895-907) mostraram que a região A de ClfA é suficiente para o fenótipo de agregação.

Contudo, anteriormente, ninguém foi capaz de gerar anticorpos monoclonais para a proteína ClfA de *S. aureus*. Por conseguinte, o presente invento refere-se a um anticorpo monoclonal 12-9 isolado e/ou purificado que se pode ligar ao subdomínio de ligação Clf33 de proteína ClfA e que assim pode ser útil em métodos de prevenção e tratamento de infecção

estafilocócica quando utilizado em quantidades eficazes para prevenir ou tratar tais infecções. Este anticorpo monoclonal pode ser produzido utilizando, e.g., o método de Kohler e Milstein, Nature 256:495-497 (1975), ou outros modos adequados conhecidos na área e, para além disso, pode ser preparado como anticorpos monoclonais quiméricos, humanizados ou humanos, de modos que serão bem conhecidos nesta área. Ainda adicionalmente, podem-se preparar anticorpos monoclonais a partir de uma cadeia simples, tal como as cadeias leve ou pesada, e para além disso podem ser preparados a partir de fragmentos activos de um anticorpo que retêm as características de ligação (e.g., especificidade e/ou afinidade) do anticorpo inteiro. Por fragmentos activos pretende-se significar um fragmento de anticorpo que tem a mesma especificidade de ligação que um anticorpo completo que se liga à proteína ClfA, e o termo "anticorpo" como aqui utilizado pretende incluir os referidos fragmentos. Adicionalmente, são também contemplados pelo presente invento antissoros preparados utilizando anticorpo monoclonal 12-9 e estes podem ser preparados de vários modos adequados como será reconhecido por um perito na especialidade.

Como indicado acima, podem-se preparar anticorpos para ClfA de vários modos adequados que serão bem conhecidos na especialidade, tais como o método de Kohler e Milstein bem estabelecido acima descrito que pode ser utilizado para gerar anticorpos monoclonais. Neste método, injectam-se ratinhos intraperitonealmente uma vez por semana durante um período prolongado com uma proteína ClfA recombinante purificada, ou uma proteína de subdomínio isolada tal como Clf40, Clf33 ou ClfA N3, ou uma sua porção activa, seguindo-se uma análise ao sangue dos ratinhos imunizados para determinar a reactividade em relação à ClfA purificada. Após identificação de ratinhos reactivos em relação a ClfA, linfócitos isolados a partir de baços de ratinho são fundidos com células de mieloma de ratinho para produzir hibridomas positivos para os anticorpos contra ClfA que são depois isolados e cultivados, seguindo-se purificação e isotipagem.

De modo a gerar anticorpos monoclonais de acordo com o invento, é assim preferido que estes sejam gerados utilizando proteínas Clf33 preparadas recombinantemente utilizando

métodos convencionais bem conhecidos na especialidade. Por exemplo, um destes métodos emprega a utilização do vector de expressão de *E. coli* pQE-30 como um vector de expressão para clonagem e expressão de proteínas e péptidos recombinantes.

Utilizando PCR, amplificou-se o domínio A de *ClfA* (Clf40 representando AA 40-559 ou Clf33 representando AA 221-550) a partir de ADN genómico de *S. aureus* Newman e subclonou-se no vector de expressão de *E. coli* PQE-30 (Qiagen), o que permite a expressão de uma proteína de fusão recombinante contendo seis resíduos histidina. Este vector foi subsequentemente transformado na estirpe de *E. coli* ATCC 55151, cultivou-se num fermentador de 15 litros até uma densidade óptica (OD₆₀₀) de 0,7 e induziu-se com isopropil-1-beta-D-galactósido (IPTG) 0,2 mM durante 4 horas. Colheram-se as células utilizando uma montagem de fibras ocas AG Technologies (tamanho de poro de 0,45 µm) e congelou-se a pasta de células a -80°C. Lisaram-se as células em PBS 1X (10 mL de tampão/1 g de pasta de células) utilizando 2 passagens através da prensa francesa a 1100 psi. Centrifugaram-se as células lisadas a 17000 rpm durante 30 minutos para remover os resíduos celulares. Fez-se passar o sobrenadante sobre uma coluna quelante HiTrap (Pharmacia) de 5 ml carregada com NiCl₂ 0,1 M. Após carregamento, lavou-se a coluna com 5 volumes de coluna de Tris 10 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM (Tampão A). Eluiu-se a proteína utilizando um gradiente de 0-100% de Tris 10 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, imidazole 200 mM (Tampão B) com 30 volumes de coluna. Clf40 ou Clf33 foram eluídas para ~13% de Tampão B (imidazole ~26 mM). Monitorizou-se a absorvância a 280 nm. As fracções contendo Clf40 ou Clf33 foram dialisadas em PBS 1x.

Submeteu-se depois a proteína a um protocolo de remoção de endotoxina. Os tampões utilizados durante este protocolo foram libertados de endotoxina por passagem sobre uma coluna Mono-Q Sepharose (Pharmacia) de 5 ml. Dividiu-se a proteína equitativamente entre tubos 4x 15 ml. Ajustou-se o volume de cada tubo a 9 ml com Tampão A. Adicionou-se 1 ml de Triton X-114 a 10% a cada tubo e incubou-se com rotação durante 1 hora a 4°C. Colocaram-se os tubos num banho de água a 37°C para separar as fases. Centrifugaram-se os tubos a 2000 rpm durante 10 minutos e recolheu-se a fase aquosa superior de cada tubo e repetiu-se a extracção com detergente.

Combinaram-se as fases aquosas da segunda extracção e fez-se passar sobre uma coluna quelante IDA (Sigma) de 5 ml, carregada com NiCl_2 0,1 M para remover o detergente restante. Lavou-se a coluna com 9 volumes de coluna de Tampão A antes de se eluir a proteína com 3 volumes de coluna de Tampão B. Fez-se passar o eluente sobre uma coluna Detoxigel (Sigma) de 5 ml e recolheu-se o caudal de saída e reaplicou-se à coluna. Recolheu-se o caudal de saída da segunda passagem e dialisou-se em PBS 1x. Analisou-se o produto purificado em relação a concentração, pureza e nível de endotoxina antes da administração aos ratinhos.

A sequência de aminoácidos para Clf40 obtida deste modo é aqui mostrada como SEQ ID NO:2, e é codificada por ácidos nucleicos possuindo a sequência apresentada na SEQ ID NO:1, ou seus degenerados. Adicionalmente, a sequência de aminoácidos para Clf33 obtida deste modo é aqui mostrada como SEQ ID NO:4, e é codificada por ácidos nucleicos possuindo a sequência apresentada na SEQ ID NO:3, ou seus degenerados.

Após isolamento do subdomínio activo Clf33 de proteína ClfA, podem-se produzir anticorpos monoclonais para esta proteína de vários modos adequados. Por exemplo, num método preferido, utilizou-se a proteína Clf33 purificada para gerar um painel de anticorpos monoclonais murinos. Resumidamente, um grupo de ratinhos Balb/C recebeu uma série de imunizações subcutâneas de 50 µg de proteína Clf40 ou Clf33 em solução ou misturadas com adjuvante como a seguir descrito:

Injecção	Dia	Quantidade (µg)	Via	Adjuvante
Primária	0	50	Subcutânea	Completo de Freund
Reforço #1	14	5 (Clf40)	Intravenosa	PBS
		10 (ClfA33)		

Três dias após o reforço final, removeram-se os baços, destacaram-se numa suspensão de células individuais e colheram-se os linfócitos. Fundiram-se depois os linfócitos com uma linha de células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC #1581). Fusão celular, plaqueamento subsequente e alimentação foram realizados de acordo com o protocolo para produção de

anticorpos monoclonais de Current Protocols in Immunology (Capítulo 2, Unidade 2.).

Quaisquer clones gerados a partir da fusão foram depois rastreados quanto à produção de anticorpo anti-Clf40 específico utilizando um ensaio ELISA padrão. Expandiram-se os clones positivos e testaram-se adicionalmente. Identificaram-se originalmente quinze clones positivos e clonaram-se por diluição limitante para caracterização adicional. Testaram-se clones de células individuais quanto a actividade num ELISA de ligação directa, um ELISA modificado para medir a inibição da ligação de fibrinogénio a Clf40, ligação de células bacterianas inteiras por citometria de fluxo e afinidade pela ligação a Clf40 por análise Biacore.

Colheram-se amostras bacterianas de *S. aureus* (estirpes Barnett, 67-0, ATCC#25923 e ATCC#49230), lavaram-se e incubaram-se com Mab 13-2, 12-9, 13-1 ou PBS sozinho (controlo) numa concentração de 2 mg/ml após bloquear os locais de proteína A com IgG de coelho (50 mg/ml). Após incubação com anticorpo, incubaram-se as células bacterianas com Cebra- $F_{(ab')_2}$ -Anti-Ratinho- $F_{(ab')_2}$ -FITC que serviu como o anticorpo de detecção. Após marcação de anticorpo, aspiraram-se as células bacterianas através do citómetro de fluxo FACScaliber para analisar a emissão de fluorescência (excitação: 488, emissão: 570). Para cada estirpe bacteriana, colheram-se e mediram-se 10000 eventos.

Revestiram-se placas de 96 poços de elevada ligação com solução 1 mg/ml de Clf40 em PBS (pH 7,4), cobriram-se e incubaram-se à temperatura ambiente durante 2 horas. Lavaram-se depois as placas com PBS, Tween 20 a 0,05% e bloquearam-se com solução de BSA a 1% durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, adicionou-se sobrenadante de anticorpo monoclonal e incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura ambiente. Lavaram-se depois as placas e adicionou-se a cada poço solução de fibrinogénio humano 0,1 mg/ml. Incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura ambiente e lavaram-se. Adicionou-se conjugado AP anti-fibrinogénio de ovelha numa diluição 1:750 em PBS, Tween 20 a 0,05%, BSA a 0,1% e deixaram-se incubar durante 1 hora à temperatura ambiente. Lavaram-se depois as placas e

adicionou-se pNPP (solução de revelação) numa concentração final de 1 mg/ml. Incubaram-se as placas 15-30 minutos a 37°C e leram-se os resultados a 405 nm e analisaram-se utilizando um leitor HTS 7000 Bio-Assay da Perkin Elmer.

Realizou-se a análise cinética num Biacore 3000 utilizando o método de captura de ligando incluído no software. Um anticorpo Fc de coelho anti-ratinho (Biacore) foi acoplado por amina a um *chip* CM5. O anticorpo monoclonal a ser analisado foi depois passado sobre o *chip*, permitindo a ligação à porção Fc. Fizeram-se depois passar sobre a superfície do *chip* concentrações variáveis da proteína Clf40 ou Clf33 e recolheram-se os dados. Utilizando o software de avaliação fornecido pela Biacore (Versão 3.1), mediram-se k_{on} e k_{off} e calcularam-se K_A e K_D .

Como mostrado pelos dados abaixo, as imunizações para gerar anticorpos monoclonais dirigidos contra Clf40 ou porções activas de Clf40 (regiões N2N3 ou N3) produziram anticorpos monoclonais com diferentes e diversos perfis de reactividade e reactividade cruzada.

Ainda que se prefira a produção de anticorpos utilizando formas recombinantes da proteína ClfA, podem também ser gerados anticorpos a partir de proteínas ClfA naturais isoladas e purificadas ou regiões, e podem ser gerados anticorpos monoclonais ou policlonais utilizando as proteínas ClfA naturais ou regiões activas do mesmo modo como acima descrito para obter tais anticorpos. Estão ainda disponíveis outros modos convencionais para gerar os anticorpos de ClfA utilizando proteínas ClfA purificadas naturais ou recombinantes ou suas regiões activas, como será reconhecido por um perito na especialidade.

Como será reconhecido por um perito na especialidade, os anticorpos do presente invento podem também ser formulados em composições farmacêuticas adequadas para administração a um paciente humano ou animal de modo a tratar ou prevenir uma infecção causada por bactérias estafilocócicas. Composições farmacêuticas contendo os anticorpos do presente invento, ou seus fragmentos aceitáveis, podem ser formuladas em combinação com qualquer veículo, excipiente ou transportador

farmacêutico adequado que será habitualmente utilizado nesta especialidade, incluindo solução salina, dextrose, água, glicerol, etanol, outros compostos terapêutico e suas combinações. Como um perito nesta especialidade reconhecerá, o veículo, excipiente ou transportador particular utilizado variará dependendo do paciente e da condição do paciente, e vários modos de administração serão adequados para as composições do invento, como será reconhecido por um técnico competente nesta especialidade. Métodos adequados de administração de qualquer composição farmacêutica revelados neste pedido de patente incluem, mas não estão limitados a, administração tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, intranasal e intradérmica.

Para administração tópica, a composição é formulada na forma de uma pomada, creme, gel, loção, gotas (tais como gotas oculares e gotas para o ouvido) ou solução (tal como um colutório). Pensos para feridas ou cirúrgicos, suturas e aerossóis podem ser impregnados com a composição. A composição pode conter aditivos convencionais, tais como conservantes, solventes para promover a penetração, e emolientes. As formulações tópicas podem também conter transportadores convencionais tais como bases de creme ou de pomada, etanol ou álcool oleílico.

Formas adicionais de composições de anticorpo, e outra informação referente a composições, métodos e aplicações em relação a outras MSCRAMM™ serão também geralmente aplicáveis ao presente invento envolvendo anticorpos para a MSCRAMM™ de ClfA e são reveladas, por exemplo, na Patente dos E.U.A. 6288214 (Hook *et al.*).

As composições de anticorpo do presente invento que são geradas contra o subdomínio Clf33 de proteína ClfA podem também ser administradas com um adjuvante adequado numa quantidade eficaz para melhorar a resposta imunogénica contra o conjugado. Por exemplo, adjuvantes adequados podem incluir alúmen (fosfato de alumínio ou hidróxido de alumínio), que é amplamente utilizado em humanos, e outros adjuvantes tais como saponina e o seu componente purificado Quil A, adjuvante completo de Freund, adjuvante RIBBI e outros adjuvantes

utilizados em aplicações de investigação e veterinárias. Podem também ainda ser úteis outras preparações definidas quimicamente tais como muramildipéptido, monofosforil-lípido A, conjugados de fosfolípido tais como os descritos por Goodman-Snitkoff et al., J. Immunol. 147:410-415 (1991), encapsulação do conjugado num proteolipossoma como descrito por Miller et al., J. Exp. Med. 176:1739-1744 (1992) e encapsulação da proteína em vesículas de lípido tais como vesículas de lípido NovasomeTM (Micro Vesicular Systems, Inc., Nashua, NH).

Em qualquer caso, as composições de anticorpo do presente invento serão assim úteis para interferência, modulação, inibição das interacções de ligação entre ClfA em bactérias estafilocócicas e fibrinogénio em células e tecidos de hospedeiro, ou desprendimento de bactérias estafilocócicas que ficaram ligadas a fibrinogénio associado a células e tecidos de hospedeiro. Por conseguinte, o presente invento terá aplicabilidade particular no desenvolvimento de composições e métodos para prevenção ou tratamento de infecções estafilocócicas, e para inibição da ligação de bactérias estafilocócicas a células e/ou tecido de hospedeiro.

São aqui proporcionados métodos para prevenção ou tratamento de uma infecção estafilocócica que compreendem administrar uma quantidade eficaz de um anticorpo para a sub-região Clf33 de ClfA como acima descrito em quantidades eficazes para tratar ou prevenir a infecção. Para além disso, estes anticorpos monoclonais mostraram ser úteis na dificuldade da ligação de bactérias estafilocócicas a fibrinogénio ou fibrina, e assim provaram ser eficazes no tratamento ou prevenção de infecção por bactérias estafilocócicas tais como *S. aureus*. Ainda adicionalmente, os anticorpos de acordo com o invento são duplamente eficazes pelo facto de terem mostrado ser reactivos de modo cruzado através de uma ampla variedade de estirpes de *S. aureus* o que assim melhorará a eficácia e a eficiência de composições baseadas nos anticorpos monoclonais do presente invento.

Por conseguinte, de acordo com o invento, a administração do anticorpo do presente invento em qualquer

dos modos convencionais acima descritos (e.g., tópico, parentérico, intramuscular, etc.), proporcionará assim um método extremamente útil para tratar ou prevenir infecções estafilocócicas em pacientes humanos ou animais. Por quantidade eficaz pretende-se significar aquele nível de utilização, tal como o nível de um título de anticorpo, que será suficiente para impedir a adesão das bactérias, para inibir a ligação de bactérias estafilocócicas a células hospedeiras e assim ser útil no tratamento ou prevenção de uma infecção estafilocócica. Como será reconhecido por um técnico competente nesta especialidade, o nível de título de anticorpo necessário para ser eficaz para tratar ou prevenir uma infecção estafilocócica variará dependendo da natureza e condição do paciente, e/ou da gravidade da infecção estafilocócica pré-existente.

Para além da utilização de anticorpo 12-9 para a sub-região Clf33 de proteína ClfA para tratar ou prevenir uma infecção por *S. aureus* como acima descrito, o presente invento contempla a utilização deste anticorpo de vários modos, incluindo a detecção da presença de *S. aureus* para diagnosticar uma infecção estafilocócica, seja num paciente ou num equipamento médico que pode também ficar infectado. Um método preferido para detectar a presença de infecções estafilocócicas envolve os passos de obter uma amostra suspeita de estar infectada por uma ou mais espécies ou estirpes de bactérias estafilocócicas, tais como uma amostra retirada de um indivíduo, por exemplo, do próprio sangue, saliva, tecidos, osso, músculo, cartilagem ou pele. As células podem depois ser lisadas, e o ADN extraído, precipitado e amplificado. Após isolamento da amostra, podem-se realizar ensaios de diagnóstico utilizando o anticorpo do presente invento para detectar a presença de *S. aureus*, e estas técnicas de ensaio para determinar uma tal presença numa amostra são bem conhecidas dos peritos na especialidade e incluem métodos tais como radioimunoensaio, análise *Western blot* e ensaios ELISA. Em geral, é contemplado um método de diagnóstico de uma infecção por *S. aureus* onde a uma amostra suspeita de estar infectada com uma infecção por *S. aureus* se adiciona um anticorpo de proteína Clf33 de acordo com o presente invento, e o *S. aureus* é indicado pela ligação de anticorpo à proteína Clf33 na amostra.

Por conseguinte, anticorpo 12-9 ou outros aqui descritos podem ser utilizados para a detecção específica de proteínas map estafilocócicas, para a prevenção de infecção por bactérias estafilocócicas, para o tratamento de uma infecção em curso ou para utilização como ferramentas de investigação. O termo "anticorpos" como aqui utilizado inclui anticorpos monoclonais, policlonais, quiméricos, de cadeia simples, biespecíficos, simianizados e humanizados ou primatizados bem como fragmentos Fab, tais como aqueles fragmentos que mantêm a especificidade de ligação dos anticorpos para a proteína Clf33, incluindo os produtos de uma biblioteca de expressão de imunoglobulina Fab. Por conseguinte, o invento contempla a utilização de cadeias simples tais como as cadeias variáveis pesada e leve dos anticorpos como será a seguir descrito. A geração de quaisquer destes tipos de anticorpos ou fragmentos de anticorpo é bem conhecida dos peritos na especialidade. No presente caso, gerou-se e isolou-se anticorpo monoclonal 12-9 para proteína Clf33 e mostrou-se que este protege contra infecção estafilocócica.

Qualquer dos anticorpos acima descritos pode ser marcado directamente com um marcador detectável para identificação e quantificação de bactérias estafilocócicas. São geralmente conhecidos dos peritos na especialidade marcadores para utilização em imunoensaios e incluem enzimas, radioisótopos, e substâncias fluorescentes, luminescentes e cromogénicas, incluindo partículas coradas tais como ouro coloidal ou pérolas de látex. Imunoensaios adequados incluem ensaios de imunossorvente ligado a enzima (ELISA).

Alternativamente, o anticorpo pode ser marcado indirectamente por reacção com substâncias marcadas que possuem uma afinidade por imunoglobulina. O anticorpo pode ser conjugado com uma segunda substância e detectado com uma terceira substância marcada possuindo uma afinidade pela segunda substância conjugada ao anticorpo. Por exemplo, o anticorpo pode ser conjugado a biotina e o conjugado de anticorpo-biotina detectado utilizando avidina ou estreptavidina marcados. Similarmente, o anticorpo pode ser conjugado a um hapteno e o conjugado anticorpo-hapteno detectado utilizando anticorpo anti-hapteno marcado. Estes e

outros métodos de marcação de anticorpos e conjugados de ensaio são bem conhecidos dos peritos na especialidade.

Podem-se também utilizar anticorpos para Clf33 como acima descrito em instalações de produção ou laboratórios para isolar quantidades adicionais das proteínas, tal como por cromatografia de afinidade. Por exemplo, os anticorpos do invento podem também ser utilizados para isolar quantidades adicionais da proteína ClfA ou seus fragmentos activos.

O anticorpo 12-9 isolado do presente invento, ou seus fragmentos activos, pode também ser utilizado no desenvolvimento de vacinas para imunização passiva contra infecções estafilocócicas. Adicionalmente, quando administrados como composição farmacêutica a uma ferida ou utilizados para revestir dispositivos médicos ou biomateriais poliméricos *in vitro* e *in vivo*, os anticorpos do presente invento podem ser úteis naqueles casos onde existe uma infecção estafilocócica prévia por causa da capacidade deste anticorpo para restringir e inibir adicionalmente a ligação de *S. aureus* a fibrinogénio ou fibrina e assim limitar a extensão e a disseminação da infecção. Para além disso, o anticorpo pode ser modificado como necessário tal que, em certos casos, seja menos imunogénico no paciente a quem é administrado. Por exemplo, se o paciente é um humano, o anticorpo pode ser "humanizado" por transplante das regiões determinantes de complementaridade do anticorpo derivado de hibridoma para um anticorpo monoclonal humano como descrito, e.g., por Jones et al., Nature 321:522-525 (1986) ou Tempest et al. Biotechnology 9:266-273 (1991) ou "embutidos" por alteração dos resíduos de estrutura murinos expostos à superfície nas regiões variáveis de imunoglobulina para mimetizar uma estrutura correspondente humana homóloga como descrito, e.g., por Padlan, Molecular Imm. 28:489-498 (1991). Ainda adicionalmente, quando assim desejado, os anticorpos monoclonais do presente invento podem ser administrados em conjunto com um antibiótico adequado para intensificar adicionalmente a capacidade das presentes composições para combater infecções bacterianas.

Dispositivos médicos ou biomateriais poliméricos a serem revestidos com os anticorpos, proteínas e fragmentos activos

aqui descritos incluem, mas não estão limitados a, agrafos, suturas, válvulas cardíacas de substituição, dispositivos de assistência cardíaca, lentes de contacto duras e moles, implantes de lente intraocular (câmara anterior ou câmara posterior), outros implantes tais como inclusões corneanas, querato-próteses, *stents* vasculares, dispositivos de epiceratofacia, *shunts* de glaucoma, agrafos retinianos, ganchos esclerais, próteses dentárias, dispositivos tiroplásticos, dispositivos laringoplásticos, enxertos vasculares, próteses de tecido mole e duro incluindo, mas não limitadas a, bombas, dispositivos eléctricos incluindo estimuladores e registadores, próteses auditivas, *pacemakers*, laringe artificial, implantes dentários, implantes mamários, implantes penianos, tendões cranio/faciais, articulações, tendões, ligamentos, meniscos e discos artificiais, ossos artificiais, órgãos artificiais incluindo pâncreas artificial, corações artificiais, membros artificiais e válvulas cardíacas; *stents*, arames, arames guia, cateteres intravenosos e venosos centrais, dispositivos para angioplastia laser e de balão, dispositivos vasculares e cardíacos (tubos, cateteres, balões), auxiliares ventriculares, componentes para diálise ao sangue, oxigenadores de sangue, dispositivos uretrais/ureterais/urinários (cateteres de Foley, *stents*, tubos e balões), cateteres das vias aéreas (tubos endotraqueais e de traqueostomia e *cuffs*), tubos de alimentação entérica (incluindo tubos nasogástricos, intragástricos e jejunais), tubos para drenagem de feridas, tubos utilizados para drenar as cavidades corporais tais como as cavidades pleurais, peritoneais, cranianas e pericárdicas, sacos para sangue, tubos de ensaio, tubos para colheita de sangue, tubos sob vácuo (*vacutainers*), seringas, agulhas, pipetas, pontas de pipeta e tubagem para sangue.

Será entendido pelos peritos na especialidade que o termo "revestido" ou "revestimento", como aqui utilizado, significa aplicar o anticorpo ou fragmento activo, ou composição farmacêutica derivada destes, a uma superfície do dispositivo, preferivelmente uma superfície exterior que será exposta a infecção bacteriana estafilocócica. Não é necessário que a superfície do dispositivo esteja

inteiramente coberta pela proteína, anticorpo ou fragmento activo.

Numa concretização preferida, o anticorpo 12-9 pode também ser utilizado como uma vacina passiva que será útil em proporcionar anticorpos adequados para tratar ou prevenir uma infecção estafilocócica. Como será reconhecido por um perito nesta especialidade, uma vacina pode ser embalada para administração de vários modos, tais como por administração parentérica (*i.e.*, intramuscular, intradérmica ou subcutânea) ou administração nasofaríngea (*i.e.*, intranasal). Um destes modos de administração é quando a vacina é injectada intramuscularmente, *e.g.*, no músculo deltóide, contudo, o modo particular de administração dependerá da natureza da infecção bacteriana com que se está a lidar e da condição do paciente. A vacine é preferivelmente combinada com um transportador farmacêuticamente aceitável para facilitar a administração, e o transportador é usualmente água ou uma solução salina tamponada, com ou sem um conservante. A vacina pode ser liofilizada para ressuspensão no momento da administração ou solução.

A dose preferida para administração de uma composição de anticorpo de acordo com o presente invento é aquela quantidade que será eficaz para prevenir ou tratar uma infecção estafilocócica, e será prontamente reconhecido que esta quantidade variará grandemente dependendo da natureza da infecção e da condição de um paciente. Como indicado acima, uma "quantidade eficaz" de anticorpo ou agente farmacêutico a utilizar de acordo com o invento pretende significar uma quantidade não tóxica mas suficiente do agente, de modo a produzir o efeito profiláctico ou terapêutico desejado. Como será salientado abaixo, a quantidade exacta do anticorpo ou de um agente particular que é requerida variará de sujeito para sujeito, dependendo da espécie, idade e condição geral do sujeito, da gravidade da condição que está a ser tratada, do transportador ou adjuvante particular que está a ser utilizado e do seu modo de administração, e outros. Por conseguinte, a "quantidade eficaz" de qualquer composição de anticorpo particular variará com base nas circunstâncias particulares, e uma quantidade eficaz apropriada pode ser determinada em cada caso de aplicação por um técnico

competente na especialidade utilizando apenas experimentação de rotina. A dose deverá ser ajustada para servir ao indivíduo a quem a composição é administrada e variará com a idade, peso e metabolismo do indivíduo. As composições podem conter adicionalmente estabilizantes ou conservantes farmacologicamente aceitáveis, tais como timerosal (sal de sódio de etil(2-mercaptobenzoato-S)mercúrio) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO).

Quando utilizados com marcadores adequados ou outras biomoléculas ou agentes químicos apropriados detectáveis, os anticorpos monoclonais aqui descritos são úteis para fins tais como diagnóstico *in vivo* e *in vitro* de infecções estafilocócicas ou detecção de bactérias estafilocócicas. A investigação em laboratório pode também ser facilitada através da utilização destes anticorpos. São bem conhecidos dos peritos na especialidade vários tipos de marcadores e métodos de conjugação dos marcadores aos anticorpos do invento, tais como os descritos abaixo.

Por exemplo, o anticorpo pode ser conjugado (directamente ou via quelação) a um marcador radioactivo tal como, mas não limitado a, ^{32}P , ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{125}I ou ^{131}I . A detecção de um marcador pode ser realizada por métodos tais como contagem de cintilação, espectrometria de raios gama ou auto-radiografia. São também úteis marcadores bioluminescentes, tais como os derivados de luciferina de pirilampo. A substância bioluminescente é ligada covalentemente à proteína por métodos convencionais, e a proteína marcada é detectada quando uma enzima, tal como luciferase, catalisa uma reacção com ATP fazendo com que a molécula bioluminescente emita fotões de luz. Podem-se também utilizar fluorogénios para marcar proteínas. Exemplos de fluorogénios incluem fluoresceína e derivados, ficoeritrina, alo-ficocianina, ficocianina, rodamina e Vermelho do Texas. Os fluorogénios são geralmente detectados por um detector de fluorescência.

A localização de um ligando em células pode ser determinada por marcação de um anticorpo como acima descrito e detecção do marcador de acordo com métodos bem conhecidos dos peritos na especialidade, tais como microscopia de

imunofluorescência utilizando procedimentos tais como os descritos por Warren e Nelson (Mol. Cell. Biol, 7: 1326-1337, 1987).

Como acima indicado, o anticorpo monoclonal do presente invento, ou seus fragmentos ou porções activas, é particularmente útil para interferir com a interacção física inicial entre um patógeno estafilocócico responsável pela infecção e um hospedeiro de mamífero, tal como a adesão das bactérias a proteínas de matriz extracelular de mamífero tal como fibrinogénio, e esta interferência com a interacção física pode ser útil tanto no tratamento de pacientes como na prevenção ou redução de infecções bacterianas em dispositivos médicos implantáveis para os tornar mais seguros para utilização.

Noutra concretização do presente invento, é proporcionado um *kit* que pode ser útil no isolamento e identificação de bactérias e infecções estafilocócicas que compreende o anticorpo do presente invento numa forma adequada, tal como liofilizada num único vaso que depois se torna activa por adição de uma amostra aquosa suspeita de conter as bactérias estafilocócicas. Um tal *kit* incluirá tipicamente um recipiente adequado para alojar o anticorpo numa forma adequada em conjunto com um reagente de detecção imunológica adequado que permitirá a identificação de ligação de complexos ao anticorpo do invento. Por exemplo, o reagente de detecção imunológica pode compreender um sinal ou marcador detectável adequado, tal como uma biotina ou enzima que produz uma cor detectável, etc., que normalmente pode ser ligado ao anticorpo ou que pode ser utilizado de outros modos adequados para proporcionar um resultado detectável quando o anticorpo se liga ao antigénio.

Resumindo, o anticorpo do presente invento que se liga à proteína Clf33 ou seus fragmentos activos são assim extremamente úteis para tratar ou prevenir infecções estafilocócicas em pacientes humanos e animais e em dispositivos médicos ou outros dispositivos implantáveis. Por conseguinte, são também aqui descritos métodos para identificação e isolamento de anticorpos que se podem ligar a Clf33 e que podem ser úteis em métodos de tratamento de

infecções estafilocócicas que envolvem morte opsonofagocítica das bactérias.

EXEMPLOS

São proporcionados os exemplos seguintes que exemplificam aspectos das concretizações preferidas do presente invento. Será reconhecido pelos peritos na especialidade que as técnicas reveladas nos exemplos que se seguem representam técnicas identificadas pelos inventores para funcionarem bem na prática do invento, e assim pode-se considerar que constituem modos preferidos para a sua prática. No entanto, à luz da presente revelação, os peritos na especialidade deverão reconhecer que se podem efectuar muitas modificações nas concretizações específicas que são reveladas e ainda assim obter um resultado idêntico ou similar sem sair do âmbito do invento.

Exemplo 1. Isolamento e sequenciação de Clf40 e Clf33

Utilizando PCR, amplificou-se o domínio A de *ClfA* (Clf40 representando AA 40-559 ou Clf33 representando AA 221-550) a partir de ADN genómico de *S. aureus* Newman e subclonou-se no vector de expressão de *E. coli* PQE-30 (Qiagen), o que permite a expressão de uma proteína de fusão recombinante contendo seis resíduos histidina. Este vector foi subsequentemente transformado na estirpe de *E. coli* ATCC 55151, cultivou-se num fermentador de 15 litros até uma densidade óptica (OD₆₀₀) de 0,7 e induziu-se com isopropil-1-beta-D-galactósido (IPTG) 0,2 mM durante 4 horas. Colheram-se as células utilizando uma montagem de fibras ocas AG Technologies (tamanho de poro de 0,45 µm) e congelou-se a pasta de células a -80°C. Lisaram-se as células em PBS 1X (10 mL de tampão/1 g de pasta de células) utilizando 2 passagens através da prensa francesa a 1100 psi. Centrifugaram-se as células lisadas a 17000 rpm durante 30 minutos para remover os resíduos celulares. Fez-se passar o sobrenadante sobre uma coluna quelante HiTrap (Pharmacia) de 5 ml carregada com NiCl₂ 0,1 M. Após carregamento, lavou-se a coluna com 5 volumes de coluna de Tris 10 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM (Tampão A). Eluiu-se a proteína utilizando um gradiente de 0-100% de Tris 10 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, imidazole 200 mM (Tampão B) com 30 volumes

de coluna. Clf40 ou Clf33 foram eluídas para ~13% de Tampão B (imidazole ~26 mM). Monitorizou-se a absorvância a 280 nm. As fracções contendo Clf40 ou Clf33 foram dialisadas em PBS 1x.

Submeteu-se depois a proteína a um protocolo de remoção de endotoxina. Os tampões utilizados durante este protocolo foram libertados de endotoxina por passagem sobre uma coluna Mono-Q Sepharose (Pharmacia) de 5 ml. Dividiu-se a proteína equitativamente entre tubos 4x 15 ml. Ajustou-se o volume de cada tubo a 9 ml com Tampão A. Adicionou-se 1 ml de Triton X-114 a 10% a cada tubo e incubou-se com rotação durante 1 hora a 4°C. Colocaram-se os tubos num banho de água a 37°C para separar as fases. Centrifugaram-se os tubos a 2000 rpm durante 10 minutos e recolheu-se a fase aquosa superior de cada tubo e repetiu-se a extracção com detergente. Combinaram-se as fases aquosas da segunda extracção e fez-se passar sobre uma coluna quelante IDA (Sigma) de 5 ml, carregada com NiCl_2 0,1 M para remover o detergente restante. Lavou-se a coluna com 9 volumes de coluna de Tampão A antes de se eluir a proteína com 3 volumes de coluna de Tampão B. Fez-se passar o eluente sobre uma coluna Detoxigel (Sigma) de 5 ml e recolheu-se o caudal de saída e reaplicou-se à coluna. Recolheu-se o caudal de saída da segunda passagem e dialisou-se em PBS 1x. Analisou-se o produto purificado em relação a concentração, pureza e nível de endotoxina antes da administração aos ratinhos.

São incluídas abaixo as sequências de proteína e ácido nucleico. A sequência de aminoácidos de Clf40 é incluída a seguir como SEQ ID NO:2, e esta é codificada pela sequência de ácido nucleico SEQ ID NO:1, e será também codificada pelos seus degenerados. A sequência de aminoácidos de Clf33 é incluída a seguir como SEQ ID NO:4, e esta é codificada pela sequência de ácido nucleico SEQ ID NO:3, e será também codificada pelos seus degenerados.

Exemplo 2. Produção de anticorpo monoclonal utilizando Clf40 e Clf33

Utilizou-se a proteína Clf40 ou Clf33 purificada para gerar um painel de anticorpos monoclonais murinos. Resumidamente, um grupo de ratinhos Balb/C recebeu uma série

de imunizações subcutâneas de 50 µg de proteína Clf40 ou Clf33 em solução ou misturadas com adjuvante como a seguir descrito na Tabela I:

Tabela I:

Injecção	Dia	Quantidade (µg)	Via	Adjuvante
Primária	0	50	Subcutânea	Completo de Freund
Reforço #1	14	5 (Clf40)	Intravenosa	PBS
		10 (Clf33)		

Três dias após o reforço final, removeram-se os baços, destacaram-se numa suspensão de células individuais e colheram-se os linfócitos. Fundiram-se depois os linfócitos com uma linha de células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC #1581). Fusão celular, plaqueamento subsequente e alimentação foram realizados de acordo com o protocolo para produção de anticorpos monoclonais de Current Protocols in Immunology (Capítulo 2, Unidade 2.).

Quaisquer clones gerados a partir da fusão foram depois rastreados quanto à produção de anticorpo anti-Clf40 específico utilizando um ensaio ELISA padrão. Expandiram-se os clones positivos e testaram-se adicionalmente. Identificaram-se originalmente quinze clones positivos e clonaram-se por diluição limitante para caracterização adicional. Testaram-se clones de células individuais quanto a actividade num ELISA de ligação directa, um ELISA modificado para medir a inibição da ligação de fibrinogénio a Clf40, ligação de células bacterianas inteiras por citometria de fluxo e afinidade pela ligação a Clf40 por análise Biacore. Os resultados dos testes estão incluídos na Tabela II seguinte:

Tabela II:

Anticorpo monoclonal de ClfA	Cinética de ligação	Inibição da ligação a fibrinogénio	Ligação a <i>S. aureus</i> Barnett	Ligação a <i>S. aureus</i> 67-0	Ligação a <i>S. aureus</i> ATCC #25923	Ligação a <i>S. aureus</i> ATCC #49230
F12-9	$k_{on} 7,74 \times 10^5$	50-70%	72%	62%	60%	94%
	$k_{off} 4,46 \times 10^{-4}$					
	$K_D 5,76 \times 10^{-10}$					
F13-1	$k_{on} 1,11 \times 10^5$	0-15%	–	–	–	9%
	$k_{off} 6,13 \times 10^{-3}$					
	$K_D 5,51 \times 10^{-6}$					
F13-2	$k_{on} 1,19 \times 10^5$	40-60%	59%	65%	55%	93%
	$k_{off} 2,81 \times 10^{-4}$					
	$K_D 2,35 \times 10^{-9}$					

Ligação a bactérias inteiras

Colheram-se amostras bacterianas de *S. aureus* (estirpes Barnett, 67-0, ATCC#25923 e ATCC#49230), lavaram-se e incubaram-se com Mab 13-2, 12-9, 13-1 ou PBS sozinho (controlo) numa concentração de 2 mg/ml após bloquear os locais de proteína A com IgG de coelho (50 mg/ml). Após incubação com anticorpo, incubaram-se as células bacterianas com Cibra-F_(ab')2-Anti-Ratinho-F_(ab')2-FITC que serviu como o anticorpo de detecção. Após marcação de anticorpo, aspiraram-se as células bacterianas através do citómetro de fluxo FACScaliber para analisar a emissão de fluorescência (excitação: 488, emissão: 570). Para cada estirpe bacteriana, colheram-se e mediram-se 10000 eventos.

Inibição (ELISA)

Revestiram-se placas de 96 poços de elevada ligação com solução de 1 µg/ml de Clf40 em PBS (pH 7,4), cobriram-se e incubaram-se à temperatura ambiente durante 2 horas. Lavaram-se depois as placas com PBS, Tween 20 a 0,05% e bloquearam-se com solução de BSA a 1% durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, adicionou-se sobrenadante de anticorpo monoclonal e incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura ambiente. Lavaram-se depois as placas e

adicionou-se a cada poço solução de fibrinogénio humano 0,1 mg/ml. Incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura ambiente e lavaram-se. Adicionou-se conjugado AP anti-fibrinogénio de ovelha numa diluição 1:750 em PBS, Tween 20 a 0,05%, BSA a 0,1% e deixaram-se incubar durante 1 hora à temperatura ambiente. Lavaram-se depois as placas e adicionou-se pNPP (solução de revelação) numa concentração final de 1 mg/ml. Incubaram-se as placas 15-30 minutos a 37°C e leram-se os resultados a 405 nm e analisaram-se utilizando um leitor HTS 7000 Bio-Assay da Perkin Elmer.

Análise cinética

Realizou-se a análise cinética num Biacore 3000 utilizando o método de captura de ligando incluído no software. Um anticorpo Fc de coelho anti-ratinho (Biacore) foi acoplado por amina a um *chip* CM5. O anticorpo monoclonal a ser analisado foi depois passado sobre o *chip*, permitindo a ligação à porção Fc. Fizeram-se depois passar sobre a superfície do *chip* concentrações variáveis da proteína Clf40 ou Clf33 e recolheram-se os dados. Utilizando o software de avaliação fornecido pela Biacore (Versão 3.1), mediram-se k_{on} e k_{off} e calcularam-se K_A e K_D .

Exemplo 3. Estudos adicionais de Clf40 e Clf33

Utilizando PCR, amplificou-se o domínio A de *ClfA* (Clf40 representando AA 40-559, domínio Clf33-N2N3 representando AA 221-550 ou domínio Clf-N3 representando AA 370-559) a partir de ADN genómico de *S. aureus* Newman e subclonou-se no vector de expressão de *E. coli* PQE-30 (Qiagen), o que permite a expressão de uma proteína de fusão recombinante contendo seis resíduos histidina. Este vector foi subsequentemente transformado na estirpe de *E. coli* ATCC 55151, cultivou-se num fermentador de 15 litros até uma densidade óptica (OD_{600}) de 0,7 e induziu-se com isopropil-1-beta-D-galactósido (IPTG) 0,2 mM durante 4 horas. Colheram-se as células utilizando uma montagem de fibras ocas AG Technologies (tamanho de poro de 0,45 μ m) e congelou-se a pasta de células a -80°C. Lisaram-se as células em PBS 1X (10 mL de tampão/1 g de pasta de células) utilizando 2 passagens através da prensa francesa a 1100 psi. Centrifugaram-se as células lisadas a 17000 rpm

durante 30 minutos para remover os resíduos celulares. Fez-se passar o sobrenadante sobre uma coluna quelante HiTrap (Pharmacia) de 5 ml carregada com NiCl_2 0,1 M. Após carregamento, lavou-se a coluna com 5 volumes de coluna de Tris 10 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM (Tampão A). Eluiu-se a proteína utilizando um gradiente de 0-100% de Tris 10 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM, imidazole 200 mM (Tampão B) com 30 volumes de coluna. A proteína Clf foi eluída para ~13% de Tampão B (imidazole ~26 mM). Monitorizou-se a absorvância a 280 nm. As fracções contendo Clf40 ou Clf33 foram dialisadas em PBS 1x.

Submeteu-se depois a proteína a um protocolo de remoção de endotoxina. Os tampões utilizados durante este protocolo foram libertados de endotoxina por passagem sobre uma coluna Mono-Q Sepharose (Pharmacia) de 5 ml. Dividiu-se a proteína equitativamente entre tubos 4x 15 ml. Ajustou-se o volume de cada tubo a 9 ml com Tampão A. Adicionou-se 1 ml de Triton X-114 a 10% a cada tubo e incubou-se com rotação durante 1 hora a 4°C. Colocaram-se os tubos num banho de água a 37°C para separar as fases. Centrifugaram-se os tubos a 2000 rpm durante 10 minutos e recolheu-se a fase aquosa superior de cada tubo e repetiu-se a extracção com detergente. Combinaram-se as fases aquosas da segunda extracção e fez-se passar sobre uma coluna quelante IDA (Sigma) de 5 ml, carregada com NiCl_2 0,1 M para remover o detergente restante. Lavou-se a coluna com 9 volumes de coluna de Tampão A antes de se eluir a proteína com 3 volumes de coluna de Tampão B. Fez-se passar o eluente sobre uma coluna Detoxigel (Sigma) de 5 ml e recolheu-se o caudal de saída e reaplicou-se à coluna. Recolheu-se o caudal de saída da segunda passagem e dialisou-se em PBS 1x. Analisou-se o produto purificado em relação a concentração, pureza e nível de endotoxina antes da administração aos ratinhos.

Produção de anticorpo monoclonal

Utilizou-se a proteína Clf40, Clf33 ou N3 purificada para gerar um painel de anticorpos monoclonais murinos. Resumidamente, um grupo de ratinhos Balb/C ou SJL recebeu uma série de imunizações subcutâneas de 1-10 mg de proteína em solução ou misturadas com adjuvante como a seguir descrito na Tabela III:

Tabela III:

Injecção RIMMS	Dia	Quantidade (mg)	Via	Adjuvante
#1	0	5	Subcutânea	FCA/RIBI
#2	2	1	Subcutânea	FCA/RIBI
#3	4	1	Subcutânea	FCA/RIBI
#4	7	1	Subcutânea	FCA/RIBI
#5	9	1	Subcutânea	FCA/RIBI

Injecção Convencional	Dia	Quantidade (mg)	Via	Adjuvante
Primária	0	5	Subcutânea	FCA
Reforço #1	14	1	Intraperitoneal	RIBI
Reforço #2	28	1	Intraperitoneal	RIBI
Reforço #3	42	1	Intraperitoneal	RIBI

No momento do sacrifício (RIMMS) ou sete dias após um reforço (convencional) recolheu-se o soro e titulou-se em ensaios ELISA contra MSCRAMM ou em células inteiras (*S. aureus* e *S. epidermidis*). Três dias após o reforço final, removeram-se os baços ou os nódulos linfáticos, destacaram-se numa suspensão de células individuais e colheram-se os linfócitos. Fundiram-se depois os linfócitos com uma linha de células de mieloma SP2/0-Ag14 (ATCC #1581). Fusão celular, plaqueamento subsequente e alimentação foram realizados de acordo com o protocolo para produção de anticorpos monoclonais de Current Protocols in Immunology (Capítulo 2, Unidade 2.).

Quaisquer clones gerados a partir da fusão foram depois rastreados quanto à produção de anticorpo anti-Clf40, SdrG ou FnbpA específico utilizando um ensaio ELISA padrão. Expandiram-se os clones positivos e testaram-se adicionalmente. Testaram-se ainda os candidatos quanto a actividade num ELISA de ligação directa, um ELISA modificado para medir a inibição da ligação de fibrinogénio a Clf40, ligação de células bacterianas inteiras por citometria de fluxo e ligação a Clf40 / inibição da ligação de fibrinogénio-Clf40 por análise Biacore.

Análise Biacore

Ao longo da análise, o caudal permaneceu constante a 10 ml/min. Antes da injeção de ClfA40, o anticorpo de teste foi

adsorvido ao *chip* através de ligação RAM-Fc. No momento 0, injectou-se ClfA 40 numa concentração de 30 mg/ml sobre o *chip* durante 3 min seguindo-se 2 minutos de dissociação. Esta fase da análise mediu as cinéticas de associação e dissociação relativas da interacção Mab/ClfA. Na segunda fase da análise, mediu-se a capacidade da ClfA ligada a Mab para interagir e se ligar a fibrinogénio. Injectou-se fibrinogénio numa concentração de 100 mg/ml sobre o *chip* e após 3 minutos colheu-se um ponto de registo.

Ligação a bactérias inteiras

Colheram-se amostras bacterianas (Newman), lavaram-se e incubaram-se com Mab ou PBS sozinho (controlo) numa concentração de 2 mg/ml após bloquear os locais de proteína A com IgG de coelho (50 mg/ml). Após incubação com anticorpo, incubaram-se as células bacterianas com Cabra-F_{(ab')₂}-Anti-Ratinho-F_{(ab')₂}-FITC que serviu como o anticorpo de detecção. Após marcação de anticorpo, aspiraram-se as células bacterianas através do citómetro de fluxo FACScaliber para analisar a emissão de fluorescência (excitação: 488, emissão: 570). Para cada estirpe bacteriana, colheram-se e mediram-se 10000 eventos.

Inibição (ELISA)

Revestiram-se placas de 96 poços de elevada ligação com solução de 1 µg/ml de Clf40 em PBS (pH 7,4), cobriram-se e incubaram-se à temperatura ambiente durante 2 horas. Lavaram-se depois as placas com PBS, Tween 20 a 0,05% e bloquearam-se com solução de BSA a 1% durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, adicionou-se sobrenadante de anticorpo monoclonal e incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura ambiente. Lavaram-se depois as placas e adicionou-se a cada poço solução de fibrinogénio humano 0,1 mg/ml. Incubaram-se as placas durante 1 hora à temperatura ambiente e lavaram-se. Adicionou-se conjugado AP anti-fibrinogénio de ovelha numa diluição 1:750 em PBS, Tween 20 a 0,05%, BSA a 0,1% e deixaram-se incubar durante 1 hora à temperatura ambiente. Lavaram-se depois as placas e adicionou-se pNPP (solução de revelação) numa concentração final de 1 mg/ml. Incubaram-se as placas 15-30 minutos a 37°C

e leram-se os resultados a 405 nm e analisaram-se utilizando um leitor HTS 7000 Bio-Assay da Perkin Elmer.

Exemplo 4. A imunização com a totalidade ou porções de Clf40 gera anticorpos monoclonais com diferentes padrões de reactividade.

A Tabela IV abaixo mostra os resultados dos ensaios de imunização com as regiões activas do presente invento, incluindo Clf40, Clf33 (que constitui a região N2N3 do domínio A de ClfA), e a região N3 de ClfA sozinha.

Tabela IV

Antigénio	Fusão	Monoclonal	Reactividade						
			ELISA		Biacore		Citometria	Inibição	FYI
			Clf40	SdrG	FnbpA	Ligação	Inibição	de fluxo	
ClfA N3 inclui os seguintes: F29 F30 F31 F32 F34 F36	RIMMS	F29-19	Y	N	N	N	N	nt	nt
		F29-71	Y	N	N	N	N	nt	nt
		F29-92	Y	N	N	N	N	nt	nt
		F31-20	Y	N	N	N	N	nt	nt
		F31-36	Y	N	N	N	N	nt	nt
		F31-100	Y	N	N	N	N	nt	nt
		F31-195	Y	N	N	N	N	nt	nt
		F32-22	Y	N	N	N	N	nt	nt
		F34-15	Y	N	N	N	N	nt	nt
		F36-77	Y	N	N	N	N	nt	nt
ClfA N2N3 (Clf33) inclui os seguintes: F11 F12 F17 F18	Convencional	F36-197	Y	N	N	N	N	nt	nt
		INH-	Y	N	N	Y	N	Y	12-9
		M010001							
		F12-3	Y	nt	nt	Y	nt	Y	N
		F12-1	Y	nt	nt	Y	nt	Y	N
ClfA N2N3 (Clf33) inclui os seguintes: F33 F35 F38 F40	RIMMS	F12-5	Y	nt	nt	Y	nt	Y	N
		F12-10	Y	nt	nt	Y	nt	Y	Y
		F33-7	Y	N	N	Y	Y	Y	nt
		F35-279	Y	N	N	Y	Y	N	nt
		F35-177	Y	N	N	Y	N	Y	nt
Clf40 inclui os seguintes: F13 F14 F15 F16	Convencional	F40-7	Y	N	N	Y	Y	Y	nt
		F38-300	Y	N	N	Y	Y	N	nt
		F35-129	Y	N	N	N	N	nt	nt
Clf40 inclui os seguintes: F13 F14 F15 F16	Convencional	INH-	Y	nt	nt	Y	N	Y	13-2
		M000030							
		INH-	Y	nt	nt	Y	N	Y	15-
		M010004							EC6
		INH-	Y	nt	nt	Y	N	N	13-1
	Convencional	M010003							
		F13-6	Y	nt	nt	Y	nt	Y	Y

Y = um resultado positivo

N = um resultado negativo

nt = não testado

Os resultados apresentados nesta tabela mostram que as imunizações para gerar anticorpos monoclonais com Clf40 ou

porções de Clf40 (N2N3 ou N3) produzem anticorpos monoclonais com amplos e diversos perfis de reactividade e que exibem reactividade cruzada substancial através de uma ampla variedade de estirpes estafilocócicas.

Exemplo 5: Utilização do Biacore para seleccionar Mabs de elevada afinidade que bloqueiam a ligação de ClfA a fibrinogénio.

Análise Biacore

Ao longo da experiência representada na Figura 1, o caudal permaneceu constante a 10 ml/min. Antes da injeção de ClfA 40, adsorveram-se ao *chip* 946 RU de Mab 13-1 e 768 RU de Mab 13-2 através de ligação RAM-Fc. No tempo 0 no gráfico, injectou-se sobre o *chip* ClfA 40 numa concentração de 30 mg/ml durante 3 min seguindo-se 2 minutos de dissociação. O Mab 13-1 ligou 58 RU de ClfA e o Mab 13-2 ligou 168 RU de ClfA no final do tempo de injeção de ClfA. Esta fase da experiência mediu as cinéticas de associação e dissociação relativas da interacção Mab/ClfA. A segunda fase da experiência mede a capacidade da ClfA ligada a Mab para interaccionar e se ligar a fibrinogénio. Injectou-se fibrinogénio sobre o *chip* numa concentração de 100 mg/ml e após 3 minutos à ClfA ligada a Mab 13-1 ligaram-se 64 RU de fibrinogénio mas à ClfA ligada a Mab 13-2 ligaram-se 0 RU de fibrinogénio.

Exemplo 6. Comparação de Mab 13.2 contra *S. aureus* estirpe Barnett e *S. aureus* ATCC 25923

Amplificação de anticorpo e purificação

Cultivaram-se células de hibridoma em meios RPMI/DMEM, 1X Nutridoma-SP contendo piruvato de sódio 2 mM, L-glutamina 4 mM e penicilina-estreptomicina 2X até volumes de cultura de 2-3 litros. Colheram-se depois os sobrenadantes de hibridoma por centrifugação. Filtraram-se os sobrenadantes através de filtros de 0,45 µm e a IgG foi purificada por afinidade utilizando cromatografia de proteína G. Eluíram-se os anticorpos monoclonais utilizando glicina 0,1 M, pH 2,7 e neutralizaram-se de imediato com um décimo de volume de Tris

2 M, pH 8,0. Dialisou-se depois a IgG purificada contra solução salina tamponada com D-fosfato 1X, pH 7,4. Se necessário, concentrou-se o anticorpo purificado e congelaram-se alíquotas.

Estirpes de *Staphylococcus aureus*

Retiraram-se células de *S. aureus* de uma reserva em glicerol congelada e inocularam-se sobre uma única placa de agár de sangue e cultivaram-se durante 24 horas a 37°C. Transferiram-se depois as colónias individuais para novas placas de agár de sangue. Inocularam-se oitenta placas para preparar 50 ml de reserva congelada final. Incubaram-se depois as placas durante 24 horas a 37°C. Após incubação, rasparam-se as colónias da superfície de cada placa para quatro tubos de 50 ml contendo 10 ml de PBS 1X (20 placas por tubo) enquanto se agitava suavemente num vórtice para remover as bactérias do raspador. Adicionaram-se depois mais 10 ml de PBS 1X aos 10 ml de suspensão bacteriana, enquanto se agitava vigorosamente num vórtice para facilitar a separação de quaisquer resíduos de agár das bactérias. Sedimentou-se a suspensão por centrifugação, 3500 x g a 4°C durante 10 minutos. Lavaram-se as bactérias em D-PBS e ressuspenderam-se em 50 ml de meio de congelação. Colocou-se a reserva bacteriana em alíquotas de 1 ml por congelação instantânea num banho de etanol/gelo seco e colocou-se num congelador a -80°C. Determinou-se a concentração (CFU/ml) da reserva congelada por descongelação de uma alíquota de 1 ml da reserva e preparação de diluições em série de 10^{-5} a 10^{-11} . Plaquearam-se diluições em duplicado sobre placas de agár de sangue e incubaram-se a 37°C durante 16-18 horas. Determinaram-se as CFU/ml (CFU/ml = (número médio de colónias × factor de diluição)/0,050 ml) e ponderaram-se para cada diluição para determinar a CFU/ml média. No dia da injeção, descongelaram-se alíquotas de cada estirpe, combinaram-se num tubo por estirpe e agitaram-se em vórtice.

Animal, sexo, espécie, número, idade e origem

Ratinhos Balb/C fêmeas (5-6 semanas de idade) foram adquiridos no Taconic Quality Laboratory Animals and Services for Research (Germantown, NY). Deixaram-se os animais

aclimatar durante pelo menos 14 dias antes do início do tratamento. À chegada, examinaram-se os ratinhos, alojaram-se em grupo (5/gaiola) em gaiolas tipo caixa de sapatos de polycarbonato com cama absorvente. Todos os ratinhos foram colocados num ciclo de 12 horas de luz-escuridão segundo as normas de pecuária requeridas que se podem encontrar no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* da NIH.

Identificação e randomização

Todos os animais foram identificados de modo único utilizando tatuagens na cauda antes da dosagem. Antes do início do tratamento, pesaram-se individualmente os animais e avaliou-se o seu estado de saúde. Randomizaram-se os ratinhos e atribuíram-se a grupos de tratamento utilizando pesos corporais estratificados.

Anticorpos monoclonais (Mab) específicos de ClfA, isótipo

Os isótipos de anticorpos monoclonais murinos específicos de ClfA foram determinados utilizando um Becton Dickinson Cytometric Bead Array para isotipagem murina. Determinou-se o isótipo utilizando citometria de fluxo de acordo com o protocolo do fabricante.

13.1 Clf40 Mab, IgG₁

13.2 Clf40 Mab, IgG₁

12.9 Clf33 Mab, IgG₁

Controlo

ATTC 1771, IgG₁

A solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4 (PBS), foi comprada na Life Technologies, Inc. (N.º de Cat. 10010-023; Lote N.º: 1078749).

Desenho experimental

Tabela V.

Grupo #	N.º de ratinhos	TRATAMENTO					DESAFIO		
		Anticorpo	Dose	Via	Frequência	Tempo	Bactéria	Diluição da reserva	Volume/Via
1	12	13-2	36 mg/kg	i.p.	Uma vez	-18 h	ATCC 25923	1:20	0.1 ml/IV
2	15	CRL-1771	36 mg/kg				ATCC 25923	1:20	
3	15	D-PBS	N/A				ATCC 25923	1:20	
4	12	13-2	36 mg/kg				Barnett	1:20	
5	15	CRL17 71	36 mg/kg				Barnett	1:20	
6	15	D-PBS	N/A				Barnett	1:20	

Dados dos animais *in vivo*

Trataram-se os ratinhos por injeção intraperitoneal (IP, 0,5 ml) com 0,5 mg de anticorpo monoclonal 13-2, anticorpo monoclonal de controlo de isótipo CRL-1771 ou PBS. Dezoito horas após administração de IgG, desafiaram-se os ratinhos com uma única injeção intravenosa (IV) de *S. aureus* estirpe Barnett ou *S. aureus* ATCC 25923. Seguiram-se os ratinhos durante 12 dias tempo após o qual todos os ratinhos restantes foram sacrificados. Foram detectadas diferenças significativas nos tempos de sobrevivência relativos entre grupos de tratamento. Oitenta por cento (10/12) dos ratinhos que receberam Mab 13-2, 13% (2/15) dos animais que receberam CRL-1771 e 0% (0/15) que receberam PBS sobreviveram ao desafio bacteriano com *S. aureus* Barnett (13-2 vs. PBS, $p < 0,0001$; 13-2 vs. CRL-1771, $p = 0,0009$). A análise estatística dos dados dos animais foi conduzida utilizando análise de sobrevivência de Kaplan-Meier com um teste de Mantel-Cox (ordenamento log). Na experiência em que *S. aureus* ATCC 25923 foi o desafio bacteriano, sobreviveram 67% (8/12) dos ratinhos aos quais de administrou Mab 13-2, 27% (4/12) sobreviveram no grupo tratado com CRL-1771 e apenas 7% (1/15) sobreviveram no grupo de PBS (13-2 vs. CRL-1771, $p = 0,02$; 13-2 vs. PBS, $p = 0,0002$). Estes resultados indicam claramente que anticorpos monoclonais específicos de MSCRAMM

proporcionam um nível de protecção significativo contra infecção letal com estirpes de *S. aureus*.

Exemplo 7. Isolamento e sequenciação de sequências da região variável.

A. Anticorpo monoclonal 13-2.

Isolou-se ARN mensageiro a partir de células de hibridoma ClfA 13-2 utilizando o *kit* Fast Track 2.0 (Invitrogen; cat. #K4500). Resumidamente, $1,4 \times 10^8$ células de hibridoma cultivadas em meio DMEM-10 com 10% de FBS foram lavadas com PBS, sedimentadas por centrifugação e depois lisadas em detergente contendo Protein/RNase Degradar. Isolou-se ARNm Poli-A⁺ por purificação de afinidade sobre oligo-dT celulose. A síntese de ADNc da primeira cadeia foi realizada utilizando 5 µg de ARNm e transcriptase reversa num *kit* de síntese de ADNc (Novagen; cat. #69001-3) contendo 20 pmol de iniciadores de 3'-oligonucleótido específicos de ratinho (Novagen; cat.# 69796 e 69812) para cada cadeia pesada variável e leve variável. Uma porção (5 a 50 ng) do ADNc foi amplificada por reacção em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o PCR Reagent System (Life Technologies; cat.#10198-018) e um conjunto de iniciadores específicos de cadeia pesada e cadeia leve variáveis de ratinho (Novagen; cat.#70081-3, 5 pmol de cada) durante 30 ciclos (início a quente a 94°C e depois ciclos de 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min e 72°C durante 1 min). Os produtos de PCR foram fraccionados electroforéticamente num gel de agarose ultra puro a 1% em tampão de acetato de sódio e visualizados por coloração com brometo de etídio. Excisaram-se do gel fragmentos de PCR correspondendo ao tamanho previsto e purificaram-se utilizando colunas *spin* BIO 101 Geneclean (cat. #1101-400) para ligação no plasmídeo pCR2.1-TOPO (Invitrogen), seguindo-se transformação em *E. coli* TOP10 competente (Invitrogen, cat.# K4500). Após isolamento de ADN de plasmídeo utilizando o *kit* QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN; cat.# 27106), identificaram-se os clones positivos com inserções por digestão com endonuclease de restrição e electroforese em gel de agarose, seguindo-se sequenciação num sequenciador automático ABI utilizando iniciadores directo M13 e reverso M13.

As sequências resultantes foram as seguintes:

13-2VLA-1 (sequência leve variável)

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA
GGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAA
GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAACTACTGA
TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAACAGTGTACAAGCTGAAGACCTG
GCAGTTTATTACTGTCATCAATACCTCTCCTCGCACACGTTCGGAGGGGGGAC
CAAGCTGGAAATAAAA

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTINSVQAEDLAVYYCHQYLSSTFGGGTKLE
IK

- Os aminoácidos representando uma CDR estão sublinhados.

13-2VHC-3 (sequência pesada variável)

CAGGTGCATCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
TGTCATCACATGCACTGTCTCTGGATTCTCATTATCCAGATATAATATACACTG
GGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGGT
GGTGAAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA
GGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGA
CACAGCCATGTACTACTGTGCCAGCGCCTACTATGGTAACTCCTGGTTTGCTTA
CTGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

QVHLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLSRYNHWRQPPGKGLEWLGMIWGGE
NTDYN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCASAYYGNSWFAYWG
QGTLVTVSA

- Os aminoácidos representando uma CDR estão sublinhados.

B. Anticorpo monoclonal 12-9.

Isolou-se ARN mensageiro a partir de células de hibridoma ClfA 12-9 utilizando o *kit* Fast Track 2.0 (Invitrogen; cat. #K4500). Resumidamente, $1,4 \times 10^8$ células de hibridoma cultivadas em meio DMEM-10 com 10% de FBS foram lavadas com PBS, sedimentadas por centrifugação e depois lisadas em detergente contendo Protein/RNase Degradar. Isolou-se ARNm Poli-A⁺ por purificação de afinidade sobre oligo-dT celulose. A síntese de ADNc da primeira cadeia foi realizada utilizando 5 µg de ARNm e transcriptase reversa num *kit* de síntese de ADNc (Novagen; cat. #69001-3) contendo 20 pmol de iniciadores de 3'-oligonucleótido específicos de ratinho (Novagen; cat.# 69796 e 69812) para cada cadeia

pesada variável e leve variável. Uma porção (5 a 50 ng) do ADNc foi amplificada por reacção em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o PCR Reagent System (Life Technologies; cat.#10198-018) e um conjunto de iniciadores específicos de cadeia pesada e cadeia leve variáveis de ratinho (Novagen; cat.#70081-3, 5 pmol de cada) durante 30 ciclos (início a quente a 94°C e depois ciclos de 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min e 72°C durante 1 min). Os produtos de PCR foram fraccionados electroforéticamente num gel de agarose ultra puro a 1% em tampão de acetato de sódio e visualizados por coloração com brometo de etídio. Excisaram-se do gel fragmentos de PCR correspondendo ao tamanho previsto e purificaram-se utilizando colunas *spin* BIO 101 Geneclean (cat. #1101-400) para ligação no plasmídeo pCR2.1-TOPO (Invitrogen), seguindo-se transformação em *E. coli* TOP10 competente (Invitrogen; cat.# K4500). Após isolamento de ADN de plasmídeo utilizando o *kit* QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN; cat.# 27106), identificaram-se os clones positivos com inserções por digestão com endonuclease de restrição e electroforese em gel de agarose, seguindo-se sequenciação num sequenciador automático ABI utilizando iniciadores directo M13 e reverso M13.

As sequências resultantes foram as seguintes:

12-9VLA-1 (sequência leve variável)

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA
GGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAA
GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA
TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT
GGCAGTTTATTACTGTCATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTTCGGAGGGGGGA
CCAAGCTGGAAATAAAA

NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISVQAEDLAVYYCHQYLSSTYFGGGTKLEI
K

- Os aminoácidos representando uma CDR estão sublinhados.

12-9VHC-1 (sequência pesada variável)

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
TGTCCATCACATGCGCTATCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTACACT

GGGTTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG
 TGGTGGAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA
 GGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACATGATGA
 CACAGCCATGTATTACTGTGCCAGAAAAGGGGAATTCTACTATGGTTACGACG
 GGTGTTGTTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCAISGFSLSRYSVHWVRQPPGKGLEWLGMIWGG
GNTDYN SALKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCARKGEFYGYDGEV
YWGQGT LVT VSA

- Os aminoácidos representando uma CDR estão sublinhados.

C. Anticorpo monoclonal 35-220.

Isolamento e sequenciação de sequências da região variável:

Isolou-se ARN mensageiro a partir de células de hibridoma ClfA 35-220 utilizando o *kit* Fast Track 2.0 (Invitrogen; cat. #K4500). Resumidamente, $1,4 \times 10^8$ células de hibridoma cultivadas em meio DMEM-10 com 10% de FBS foram lavadas com PBS, sedimentadas por centrifugação e depois lisadas em detergente contendo Protein/RNase Degradar. Isolou-se ARNm Poli-A⁺ por purificação de afinidade sobre oligo-dT celulose. A síntese de ADNc da primeira cadeia foi realizada utilizando 5 mg de ARNm e transcriptase reversa num *kit* de síntese de ADNc (Novagen; cat. #69001-3) contendo 20 pmol de iniciadores de 3'-oligonucleótido específicos de ratinho (Novagen; cat. # 69796 e 69812) para cada cadeia pesada variável e leve variável. Uma porção (5 a 50 ng) do ADNc foi amplificada por reacção em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o PCR Reagent System (Life Technologies; cat. #10198-018) e um conjunto de iniciadores específicos de cadeia pesada e cadeia leve variáveis de ratinho (Novagen; cat. #70081-3, 5 pmol de cada) durante 30 ciclos (início a quente a 94°C e depois ciclos de 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min e 72°C durante 1 min). Os produtos de PCR foram fraccionados electroforéticamente num gel de agarose ultra puro a 1% em tampão de acetato de sódio e visualizados por coloração com brometo de etídio. Excisaram-se do gel fragmentos de PCR correspondendo ao tamanho previsto e purificaram-se utilizando colunas *spin* BIO 101 Geneclean (cat. #1101-400) para ligação no plasmídeo pCR2.1-TOPO (Invitrogen), seguindo-se transformação em *E. coli* TOP10 competente (Invitrogen, cat. # K4500). Após isolamento de ADN de plasmídeo utilizando o *kit* QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN;

cat.# 27106), identificaram-se os clones positivos com inserções por digestão com endonuclease de restrição e electroforese em gel de agarose, seguindo-se sequenciação num sequenciador automático ABI utilizando iniciadores directo M13 e reverso M13.

As sequências resultantes foram as seguintes:

35-220VLD-4 (ADN de sequência leve variável)

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA
GGTCACTATGAGCTGTAGGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAA
GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTACACTGCTGA
TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT
GGCAGTTTATTACTGTCATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGAGGGGGGA
CCAAGCTGGAAATAAAA

35-220VLD-4 (sequência leve variável)

N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C R S S Q S V L
Y S S N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S P T L L I Y W A S T R
E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A
V Y Y C H Q Y L S S Y T F G G G T K L E I K

Os aminoácidos representando uma CDR estão sublinhados.

35-220VHC-1 (ADN de sequência pesada variável)

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
TGTCCATCACATGCACTGTCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTA
GGGTTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG
TGGTGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCACCAA
GGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGA
CACAGCCATGTACTACTGTGCCACCGCCTACTATGGTAACCTCCTGGTTTGCTTA
CTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

35-220VHC-1 (sequência pesada variável)

Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L S R
Y S V H W V R Q P P G K G L E W L G M I W G G G N T D Y N
S A L K S R L S I T K D N S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A
M Y Y C A T A Y Y G N S W F A Y W G Q G T L V T V S A

Os aminoácidos representando uma CDR estão sublinhados.

D. Anticorpo monoclonal 35-006.

Isolamento e sequenciação de sequências da região variável:

Isolou-se ARN mensageiro a partir de células de hibridoma ClfA 35-006 utilizando o *kit* Fast Track 2.0 (Invitrogen; cat. #K4500). Resumidamente, $1,4 \times 10^8$ células de hibridoma cultivadas em meio DMEM-10 com 10% de FBS foram lavadas com PBS, sedimentadas por centrifugação e depois lisadas em detergente contendo Protein/RNase Degradar. Isolou-se ARNm Poli-A⁺ por purificação de afinidade sobre oligo-dT celulose. A síntese de ADNc da primeira cadeia foi realizada utilizando 5 mg de ARNm e transcriptase reversa num *kit* de síntese de ADNc (Novagen; cat. #69001-3) contendo 20 pmol de iniciadores de 3'-oligonucleótido específicos de ratinho (Novagen; cat.# 69796 e 69812) para cada cadeia pesada variável e leve variável. Uma porção (5 a 50 ng) do ADNc foi amplificada por reacção em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o PCR Reagent System (Life Technologies; cat.#10198-018) e um conjunto de iniciadores específicos de cadeia pesada e cadeia leve variáveis de ratinho (Novagen; cat.#70081-3, 5 pmol de cada) durante 30 ciclos (início a quente a 94°C e depois ciclos de 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min e 72°C durante 1 min). Os produtos de PCR foram fraccionados electroforéticamente num gel de agarose ultra puro a 1% em tampão de acetato de sódio e visualizados por coloração com brometo de etídio. Excisaram-se do gel fragmentos de PCR correspondendo ao tamanho previsto e purificaram-se utilizando colunas *spin* BIO 101 Geneclean (cat. #1101-400) para ligação no plasmídeo pCR2.1-TOPO (Invitrogen), seguindo-se transformação em *E. coli* TOP10 competente (Invitrogen, cat.# K4500). Após isolamento de ADN de plasmídeo utilizando o *kit* QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN; cat.# 27106), identificaram-se os clones positivos com inserções por digestão com endonuclease de restrição e electroforese em gel de agarose, seguindo-se sequenciação num sequenciador automático ABI utilizando iniciadores directo M13 e reverso M13.

As sequências resultantes foram as seguintes:

35-006VLD-1 (ADN de sequência leve variável)

AACATTATGATGACACAGTCGCCATCATCTCTGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAA
GGTCACTATGAGCTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAA
GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA
TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT
GGCAGTTTATTGCTGTCATCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGAGGGGGGA
CCGAGCTGGAAATAAAA

35-006VLD-1 (sequência leve variável)

N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C K S S Q S V L
Y S S N Q K N Y L A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R
E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D L A
V Y C C H Q Y L S S Y I F G G G T E L E I K

Os aminoácidos representando uma CDR estão sublinhados.

35-006VHC-1 (ADN de sequência pesada variável)

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCACCCCTCACAGAGCC
TGTCCATCACATGCACTGTCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTACACT
GGGTTCCGCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG
TGGTGGAAAGCACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAACATCAGCAA
GGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACCTGATGA
CACAGCCATGTACTACTGTGCCAGAAGGCTCTGGTACTTCGATGTCTGGGGCG
CAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

35-006VHC-1 (sequência pesada variável)

Q V Q L K E S G P G L V A P S Q S L S I T C T V S G F S L S R
Y S V H W V R Q P P G K G L E W L G M I W G G G S T D Y N
S A L K S R L N I S K D N S K S Q V F L K M N S L Q T D D T A
M Y Y C A R R L W Y F D V W G A G T T V T V S S

Os aminoácidos representando uma CDR estão sublinhados.

Exemplo 8. Geração de 12-9 quimérico com equivalência em cinética de ligação e reactividade com células inteiras ao 12-9 murino.

Foi gerado 12-9 quimérico utilizando regiões constantes de humano (cadeia leve: capa; cadeia pesada: G1, 3 ou 4)

isoladas a partir de sangue de voluntários humanos (selecção de ARN poli A e amplificação por PCR de ADNc de primeira cadeia). Para expressão em células de mamífero, adicionou-se um único local de restrição Bsm 1 à extremidade 5' de ambas as sequências da região variável de cadeia pesada e leve. Na extremidade 3' (a junção de montagem (*splice*) para a região constante respectiva) adicionou-se um local Bsiw1 à região variável de cadeia leve e um local Apa1 à região variável de cadeia pesada. Isto foi realizado através do desenho de iniciadores de oligonucleótido e amplificação por PCR do modelo de ADN 12-9 apropriado seguindo-se sequenciação de ADN para confirmação.

A expressão de versões quiméricas de proteína 12-9 foi realizada utilizando o vector de expressão de mamífero pCEP4 (Invitrogen, cat.#V044-50) contendo uma sequência de secreção líder de imunoglobulina humana (Bsm1 como o local de clonagem) com uma região constante capa para expressão da cadeia leve ou uma região constante gama (1, 3 ou 4) para expressão da cadeia pesada. O plasmídeo de expressão de mamífero foi desenhado para expressão de ambas as cadeias pesada e leve com promotores de hCMV separados no mesmo plasmídeo ou para a expressão das cadeias leve e pesada em plasmídeos pCEP4 separados *vía* co-transfecção. O 12-9 quimérico funcional foi expresso após transfecção de ADN de plasmídeo contendo as cadeias pesada e leve de 12-9 em células HEK293 EBNA com Eugene (Roche Diagnostic, cat.# 1814443) sob selecção com higromicina (300 µg/ml). Colheram-se os sobrenadantes e analisaram-se por Biacore em relação à cinética de ligação e por citometria de fluxo em relação à ligação a células de *S. aureus*.

Os resultados representados nas Figuras 2 e 3 com 12-9 quimérico recombinante confirmam que a sequência das cadeias pesada e leve de 12-9 replica a cinética de ligação e a especificidade do 12-9 original caracterizado como um sobrenadante de hibridoma.

Exemplo 9. Humanização das regiões variáveis de cadeia pesada e leve de 12-9

Este processo de humanização incide sobre a alteração apenas dos resíduos expostos a solvente das regiões variáveis de ratinho que não estão envolvidas na especificidade e afinidade da molécula pelo antígeno alvo ClfA. A informação para estas determinações utilizou determinações de disponibilidade a solvente publicadas por Padlan ("A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand binding properties", *Molecular Immunology*, 28(4); 489-498, 1991), e a modelação molecular *in silico* ou algoritmos para determinar epítomos de células T não foram utilizados para efectuar estas determinações.

A abordagem representa um processo pelo qual os resíduos da região variável de ratinho da cadeia pesada e leve são alterados por mutagénese dirigida para reflectir a arquitectura exposta à superfície da região variável humana mais homóloga a partir da base de dados pública. Especificamente, aos aminoácidos definindo as cadeias pesada e leve variáveis, atribuiu-se um número de posição de Kabot e uma designação de "exposição" baseada em Padlan, permitindo o alinhamento dos aminoácidos de cada subgrupo de estrutura (*framework*) humano (I-III para a cadeia pesada e I-IV para a cadeia leve). Para suportar esta análise, foi realizada uma pesquisa BLAST na base de dados de imunoglobulina humana bem como na base de dados de proteína inteira onde a região variável com a homologia mais elevada com a sequência de ratinho (de linha germinal e madura) foi escolhida e alinhada com a sequência murina de interesse. Uma vez alinhadas, identificou-se o subgrupo de humano com a homologia mais elevada com a sequência de ratinho. Os resíduos aminoácido de ratinho expostos foram mutados para mimetizar o subgrupo de humano mais homólogo. Em casos onde existia mais do que um aminoácido no subgrupo nessa posição, utilizou-se o aminoácido representado na sequência da linha germinal de humano com a homologia mais elevada com o 12-9. Estas alterações foram efectuadas com oligonucleótidos mutagénicos via PCR seguida de sequenciação de ADN conformacional.

12-9VL-Hu (ADN de sequência leve variável humanizada)

```
GACATTGTGATGACACAGTCGCCAGACTCTCTGGCTGTGTCTCTGGGAGAAAAG
GGTCACTATGAACTGTAAGTCCAGTCAAAGTGTTTTATACAGTTCAAATCAGAA
GAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGA
TCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGTGTCCCTGATCGCTTCAGCGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTGTACAAGCTGAAGACCT
GGCAGTTTATTACTGTCAATACCTCTCCTCGTACACGTTCCGAGGGGGGA
CCAAGCTGGAAATAAAA
```

12-9VL-Hu (sequência leve variável humanizada)

DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCHQYLSSYTFGGGTKLE
 IK

Os aminoácidos representando uma CDR estão sublinhados, os aminoácidos a negrito representam a alterações de humanização.

12-9VH-Hu (ADN de sequência pesada variável humanizada)

```
CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAGCCCTCACAGACCC
TGTCCATCACATGCACCATCTCTGGGTTCTCATTATCCAGATATAGTGTACACT
GGGTTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAATGATATGGGG
TGGTGGAAACACAGACTATAATTCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCAGCAA
AGACAACTCCAAGAACCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGACCGCCGCTGA
CACAGCCGTGTATTACTGTGCCAGAAAAGGGGAATTCTACTATGGTTACGACG
GGTTTGTTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCC
```

12-9VH-Hu (sequência pesada variável humanizada)

QVQLKESGPGLVKPSQTLSITCTISGFSLSRYSVHWVRQPPGKGLEWLGMIWGG
GNTDYNSALKSRLSISKDNSKNQVFLKMNSLTAADTAVYYCARKGEFYGYDGFV
YWGQGTLVTVSS

Os aminoácidos representando uma CDR estão sublinhados, os aminoácidos a negrito representam a alterações de humanização.

Exemplo 10. Comparação dos anticorpos monoclonais de ClfA, 12-9A (INH-M010001) e 35-052.1 (INH-M01016), com o anticorpo CRL1771 de controlo com o mesmo isótipo, INH-M000029, num modelo de sepsia de ratinho utilizando *S. aureus* da estirpe 67-0 resistente a meticilina (MRSA).

O propósito deste exemplo é caracterizar os efeitos protectores dos anticorpos monoclonais de ClfA, 12-9A (INH-M010001) e 35-052.1 (INH-M01016) em comparação com o anticorpo CRL1771 de controlo com o mesmo isótipo (INH-M000029) utilizando uma dose de 0,3 mg de anticorpo e *S. aureus* da estirpe 67-0 num modelo de sepsia de ratinho.

Espécie	Estirpe	Sexo	Número	Idade*	Peso*	Origem*
Ratinho	Balb/C	Fêmea	90	4-5 semanas	12-16 gramas	Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY)

*Intervalo estimado no início do estudo.

A dosagem foi realizada pela administração de uma injeção intraperitoneal (i.p.) de anticorpo monoclonal aos animais apropriados (ver abaixo). A administração do anticorpo foi realizada aproximadamente 18 horas antes da injeção intravenosa (i.v.) de *S. aureus*. A infecção sistémica foi medida utilizando um único parâmetro (mortalidade).

Grupo#	N.º de ratinhos	TRATAMENTO					DESAFIO		
		Anticorpo	Dose	Via	Frequência	Tempo*	Bactéria	CFU	Volume/Via
1	30	12-9A	0,3 mg	i.p.	Uma vez	-18 h	<i>S. aureus</i> 67-0	~10 ⁸	0,1 ml / i.v.
2	30	35-052	0,3 mg						
3	30	CRL1771	0,3 mg						

*Os tempos reflectem as horas após desafio bacteriano.

Preparação, armazenamento e manuseamento:

Staphylococcus aureus

Retiraram-se células MRSA da estirpe 67-0 de uma reserva em glicerol congelada e inocularam-se sobre uma única placa de agár de sangue e cultivaram-se durante 24 horas a 37°C. Transferiram-se depois as colónias individuais para novas placas de agár de sangue. Inocularam-se oitenta placas para preparar 50 ml de reserva congelada final. Incubaram-se depois as placas durante 24 horas a 37°C. Após incubação,

rasparam-se as colónias da superfície de cada placa para quatro tubos de 50 ml contendo 10 ml de PBS 1X (20 placas por tubo) enquanto se agitava suavemente num vórtice para remover as bactérias do raspador. Adicionaram-se depois mais 10 ml de PBS 1X aos 10 ml de suspensão bacteriana, enquanto se agitava vigorosamente num vórtice para facilitar a separação de quaisquer resíduos de agár das bactérias. Sedimentou-se a suspensão por centrifugação, 3500 x g a 4°C durante 10 minutos. Lavaram-se as bactérias em D-PBS e ressuspenderam-se em 50 ml de meio de congelação. Colocou-se a reserva bacteriana em alíquotas de 1 ml por congelação instantânea num banho de etanol/gelo seco e colocou-se num congelador a -80°C. Determinou-se a concentração (CFU/ml) da reserva congelada por descongelação de uma alíquota de 1 ml da reserva e preparação de diluições em série de 10^{-5} a 10^{-11} . Plaquearam-se diluições em duplicado sobre placas de agár de sangue e incubaram-se a 37°C durante 16-18 horas. Determinaram-se as CFU/ml (CFU/ml = (número médio de colónias × factor de diluição)/0,050 ml) e ponderaram-se para cada diluição para determinar a CFU/ml média. No dia da injeção, serão descongeladas alíquotas de cada estirpe, combinadas num tubo por estirpe e agitadas em vórtice. Serão então preparadas diluições de cada reserva.

Anticorpo monoclonal de ClfA 12-9A, INH-M010001 (LN: IAA2E1354)

O anticorpo monoclonal 12-9A (subtipo IgG₁) foi purificado a partir de meio de cultura de hibridoma isento de soro utilizando cromatografia de afinidade de proteína G. Verificou-se que o material estava numa concentração de 7,0 mg/ml com uma concentração de endotoxina de 1,0 EU/mg de proteína. O material foi armazenado refrigerado a 4°C. No dia de injeção, o material será diluído a 0,6 mg/ml e serão administrados 0,5 ml através de uma injeção intraperitoneal ao grupo de animais apropriado. A dose final que será administrada será 0,3 mg de IgG.

Anticorpo monoclonal de ClfA 35-052.1, INH-M01016 (LN: IAA2H1422)

O anticorpo monoclonal 35-052 (subtipo IgG₁) foi purificado a partir de meio de cultura de hibridoma isento de soro utilizando cromatografia de afinidade de proteína G. Verificou-se que o material estava numa concentração de 4,2 mg/ml com uma concentração de endotoxina de 1,0 EU/mg de proteína. O material foi armazenado refrigerado a 4°C. No dia de injeção, o material será diluído a 0,6 mg/ml e serão administrados 0,5 ml através de uma injeção intraperitoneal ao grupo de animais apropriado. A dose final que será administrada será 0,3 mg de IgG.

Anticorpo monoclonal de controlo CRL 1771 (INH-M000029, LN: IAA2E1337)

O anticorpo monoclonal CRL 1771 (subtipo IgG₁) foi purificado a partir de meio de cultura de hibridoma isento de soro utilizando cromatografia de afinidade de proteína G. Verificou-se que o material estava numa concentração de 5,0 mg/ml com uma concentração de endotoxina de 0,2 EU/mg de proteína. O material foi armazenado refrigerado a 4°C. No dia de injeção, o material será diluído a 0,6 mg/ml e serão administrados 0,5 ml através de uma injeção intraperitoneal. A dose final que será administrada será 0,3 mg de IgG.

Alojamento, alimento, água e ambiente:

Na recepção, examinaram-se todos os animais e alojaram-se em grupo (5/gaiola) em gaiolas tipo caixa de sapatos de polycarbonato com cama absorvente *bed-o-cobb*. Todos os animais têm acesso livre a alimento (dieta granulada para ratinho Harlan/Teklad #7012) e água da torneira com um ciclo de 12 horas de luz-escuridão. Todos os aspectos de cuidados dos animais e as condições de pecuária requeridas estarão de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* da NIH.

Identificação e randomização

Todos os ratinhos foram identificados de modo único por tatuagem na cauda antes do tratamento. Antes do tratamento, pesaram-se individualmente os ratinhos e reavaliou-se o seu estado de saúde. Os ratinhos foram atribuídos a grupos de tratamento com base em randomização por pesos corporais estratificados.

Os dados demonstram o valor terapêutico de um anticorpo anti-ClfA tal como 12-9 que interfere com a adesão ClfA - fibrinogénio em comparação com um controlo de isótipo não específico de ClfA (CRL 1771) bem como um controlo específico (35-052) que reconhece ClfA num local independente da ligação ClfA - fibrinogénio.

Exemplo 11. Reconhecimento da estirpe de *S. aureus* de 12-9 e 35-052 em comparação com o controlo de isótipo (CRL 1771)

Colheram-se amostras bacterianas de *S. aureus* (estirpes Newman -WT, 67-0, 560 Sal 1, 203 Sal 2, 451 Sal 4, 206 Sal 5, 397 Sal 6, 49, 189, 203 e 4046) às 3 h e durante a noite, lavaram-se e incubaram-se com Mab 12-9, 35-52 ou 1771 sozinho (controlo) numa concentração de 2 mg/ml após bloquear os locais de proteína A com IgG de coelho (50 mg/ml). As estirpes de *S. aureus* contendo uma designação Sal representam 5 linhagens distintas totalizando 65,68% de todos os isolados clínicos (Booth, et al., Infect. Immun. 69, 345-353, 2001). Analisaram-se também Newman ClfA::emr (ClfA *knockout*) e Newman Spa::kan (Proteína A *knockout*) do mesmo modo como controlos de especificidade. Após incubação com anticorpo, incubaram-se as células bacterianas com Cabra-F_{(ab')₂}-Anti-Ratinho-P_{(ab')₂}-FITC que serviu como o anticorpo de detecção. Após marcação de anticorpo, aspiraram-se as células bacterianas através do citómetro de fluxo FACScaliber para analisar a emissão de fluorescência (excitação: 488, emissão: 570). Para cada estirpe bacteriana, colheram-se e mediram-se 10000 eventos.

Tabela VI. Reactividade da estirpe de *S. aureus*

		Intensidade de fluorescência (média geométrica)		
Estirpe de <i>S. aureus</i>	Tempo de cultura	12-9	35-052	CRL 1771
Newman WT	3 h	30,8	11,1	0,5
	durante a noite	44,3	30	0,9
67-0	3 h	11,2	4,2	2
	durante a noite	27,6	1,9	1,1
560 SAL 1	3 h	28,8	8,4	3,9
	durante a noite	36,1	6,2	1,2
203 SAL 2	3 h	16,1	0,6	2,2
	durante a noite	40,4	1,9	1,4
451 SAL 4	3 h	1,1	0	0
	durante a noite	12,9	0	0
206 SAL 5	3 h	8,8	1,3	1
	durante a noite	33,5	7,7	0,9
397 SAL 6	3 h	28,9	7,9	0,3
	durante a noite	62,1	40,0	1,0
49 Europe	3 h	7,3	1,2	0
	durante a noite	11,3	5,7	0
189 Japan	3 h	11,0	0	0
	durante a noite	15,7	0	0
203 Singapore	3 h	22,1	3,3	0,1
	durante a	15,4	2,5	0,2

		Intensidade de fluorescência (média geométrica)		
Estirpe de <i>S. aureus</i>	Tempo de cultura	12-9	35-052	CRL 1771
	noite			
4046 USA	3 h	27,7	2,5	1,3
	durante a noite	23,5	1,2	0,3
Newman ClfA::emr	3 h	0,2	0,3	0,2
	durante a noite	1,4	0,8	0,9
Newman Spa::kan	3 h	18,6	4,9	0
	durante a noite	23,9	9,2	0
☐ Indica actividade positiva				

Estes dados salientam a importância de se seleccionar um anticorpo anti-ClfA (tal como 12-9) que é capaz de reconhecer um epítopo funcional na molécula de ClfA: *i.e.* o local de ligação para fibrinogénio.

Outro conjunto de isolados de *S. aureus*, uma representação de 11 complexos de genótipo clonal diferente identificados como desproporcionadamente comuns como causas de doença, obtidos através de tipagem de sequência multi-locus (Day, et al. 2001, "A link between virulence and ecological abundance in natural populations of *Staphylococcus aureus*", Science, 292:114-116). Cada estirpe foi testada quanto à reactividade contra 12-9 por citometria de fluxo como acima descrito.

Tabela VII. Reactividade de 12-9 com isolados de *S. aureus*

Designação da estirpe de <i>S. aureus</i>	Tipo de sequência	Complexo clonal	Reactividade de 12-9
16	25	8	+
96	47	10	+
117	12	4	+
138	30	9	+
150	9	14	+
160	34	7	+
207	15	5	+
252	36	9	+
315	8	3	+
364	39	9	+
396	30	9	+
433	5	2	+
434	8	3	+
451	5	2	+
456	45	10	+
458	15	5	+
476	1	1	+
481	47	10	+
512	1	1	+
597	25	8	+
720	22	7	+
730	45	10	+
837	12	4	+
863	20	11	+
888	39	9	+
959	34	9	+

Esta reactividade demonstra adicionalmente a conservação do epítopo 12-9 em ClfA através de estirpes isoladas de *S.*

aureus, sugerindo que a ligação ClfA - fibrinogénio é conservada funcionalmente.

Exemplo 12. Homologia de região variável em anticorpos anti-ClfA que inibem a ligação de células inteiras de *S. aureus*.

Um resultado inesperado da selecção de anticorpos anti-ClfA baseada na sua capacidade para inibir a ligação de ClfA a fibrinogénio foi a similaridade nas sequências de aminoácidos da região determinante de complementaridade (CDR) das regiões de cadeia variável leve e pesada. Para determinar estes perfis, seleccionaram-se anticorpos anti-ClfA com base na inibição da ligação de células inteiras de *S. aureus* a placas revestidas com fibrinogénio utilizando o procedimento seguinte: Diluíram-se os anticorpos de interesse em série começando com 4 µg/ml em tampão de ensaio. Concorrentemente, lavou-se uma cultura de um dia para o outro de *S. aureus* (Newman spa::kan), bloqueou-se com IgG de coelho e depois corou-se com corante de ADN fluorescente permeável nas células Syto 13 e incubou-se durante 10 min. Misturaram-se volumes iguais de células coradas e anticorpo diluído e incubaram-se a 4°C durante 30 min e depois adicionou-se cada amostra a poços em duplicado de uma placa de microtitulação bloqueada/revestida com fibrinogénio humano. Incubaram-se as placas a 4°C durante uma hora, lavaram-se, adicionou-se tampão a cada poço e leu-se num leitor de placas fluorescentes.

As cadeias variáveis leve e pesada dos anticorpos monoclonais anti-ClfA, 12-9, 13-2, 35-006 e 35-220 bem como CRL 1771 (controlo não específico) foram clonadas e sequenciadas para derivar uma sequência de aminoácidos prevista do seguinte modo: Resumidamente, $1,4 \times 10^8$ células de hibridoma cultivadas em meio DMEM-10 com 10% de FBS foram lavadas com PBS, sedimentadas por centrifugação e depois lisadas em detergente contendo Protein/RNase Degradar. Isolou-se ARNm Poli-A⁺ por purificação de afinidade sobre oligo-dT celulose. A síntese de ADNc da primeira cadeia foi realizada utilizando 5 mg de ARNm e transcriptase reversa num kit de síntese de ADNc (Novagen; cat. #69001-3) contendo 20 pmol de iniciadores de 3'-oligonucleótido específicos de ratinho (Novagen; cat.# 69796 e 69812) para cada cadeia

pesada variável e leve variável. Uma porção (5 a 50 ng) do ADNc foi amplificada por reacção em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o PCR Reagent System (Life Technologies; cat.#10198-018) e um conjunto de iniciadores específicos de cadeia pesada e cadeia leve variáveis de ratinho (Novagen; cat.#70081-3, 5 pmol de cada) durante 30 ciclos (início a quente a 94°C e depois ciclos de 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min e 72°C durante 1 min). Os produtos de PCR foram fraccionados electroforéticamente num gel de agarose ultra puro a 1% em tampão de acetato de sódio e visualizados por coloração com brometo de etídio. Excisaram-se do gel fragmentos de PCR correspondendo ao tamanho previsto e purificaram-se utilizando colunas *spin* BIO 101 Geneclean (cat. #1101-400) para ligação no plasmídeo pCR2.1-TOPO (Invitrogen), seguindo-se transformação em *E. coli* TOP10 competente (Invitrogen, cat.# K4500). Após isolamento de ADN de plasmídeo utilizando o *kit* QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN; cat.# 27106), identificaram-se os clones positivos com inserções por digestão com endonuclease de restrição e electroforese em gel de agarose, seguindo-se sequenciação num sequenciador automático ABI utilizando iniciadores directo M13 e reverso M13.

Como se mostra na Figura 7, os dados mostram que existe conservação considerável na porção mais variável das cadeias de imunoglobulina que definem a especificidade de ligação pelos anticorpos monoclonais anti-ClfA com inibição da ligação de *S. aureus* a fibrinogénio. Esta homologia é representada a partir de três fusões geradoras de hibridoma diferentes (12, 13 e 35); sob condições variáveis tais como a constituição do antigénio ClfA, o método e a sequência das imunizações antes da fusão. Em particular, estes dados revelaram regiões conservadas de consenso nas regiões CDR1 e CDR2 da cadeia pesada variável de anticorpos monoclonais que se ligam a ClfA bem como regiões conservadas nas regiões CDR1, CDR2 e CDR3 das cadeias leves variáveis dos anticorpos do presente invento. Estes dados mostram assim que a preparação de anticorpos com as sequências conservadas deverão ter as mesmas propriedades de ligação e assim cairão dentro do âmbito do presente invento.

Por conseguinte, de acordo com o presente invento, anticorpos que se ligarão a ClfA podem ser preparados utilizando cadeias variáveis leve e pesada que têm as mesmas regiões CDR chave como indicado no consenso da Figura 8. Em particular, estes anticorpos incluirão aqueles que possuem uma cadeia pesada variável onde a região CDR1 inclui a sequência RYSVH, e/ou uma região CDR2 que inclui a sequência MIWGGGNTDYN SALKS, e uma cadeia leve variável que possui uma região CDR1 que inclui a sequência KSSQSVLYSSNQKNYLA, uma região CDR2 que inclui a sequência WASTRES, e/ou uma região CDR3 que inclui a sequência HQYLSSYT.

Exemplo 13. Expressão de 12-9 humanizado para utilização pré-clínica e clínica

Para expressão simultânea das cadeias polipeptídicas de imunoglobulina pesada e leve, os dois genes foram clonados num único plasmídeo com cada gene sob o controlo de um promotor hCMV-MIE separado. Este vector de duplo gene inclui uma única cópia do marcador seleccionável GS (Lonza; Slough, Reino Unido) para introdução na célula hospedeira num único evento de transfecção. Transfectaram-se as células utilizando Eugene-6 (Roche) sob condições sugeridas pelo fabricante. Testaram-se os sobrenadantes de linhas de células transientes ou derivadas de modo estável e compararam-se com 12-9 derivado de murino e quimérico.

Este exemplo demonstra que o 12-9 humanizado pode ser humanizado, clonado e expresso numa única cassette de expressão capaz de rendimentos para suportar uma qualidade e pureza à escala comercial.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> PATTI, Joseph M HUTCHINS, Jeff T DOMANSKI, Paul PATEL, Pratiksha HALL, Andrea

<120> ANTICORPOS MONOCLONAIIS PARA A PROTEÍNA CLFA ...

<130> P07069US04/BAS

<150> 60/308116

<151> 2001-07-30

<150> 60/298413

<151> 2001-06-18

<150> 60/274611

<151> 2001-03-12

<150> 60/264072

<151> 2001-01-26

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1560

<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 1

```

agtgaaaata gtgttacgca atctgatagc gcaagtaacg aaagcaaaag taatgattca      60
agtagcggtta gtgctgcacc taaaacagac gacacaaacg tgagtgatac taaaacatcg     120
tcaaacacta ataatggcga aacgagtggtg gcgcaaaatc cagcacaaca ggaaacgaca     180
caatcatcat caacaaatgc aactacggaa gaaacgccgg taactggtga agctactact     240
acgacaacga atcaagctaa tacaccggca acaactcaat caagcaatac aaatgccggag     300
gaattagtga atcaaacaag taatgaaacg actttttaatg atactaatac agtatcatct     360
gtaaattcac ctcaaaattc tacaatgcg gaaaatgttt caacaacgca agatacttca     420
actgaagcaa caccttcaaa caatgaatca gctccacaga gtacagatgc aagtaataaa     480
gatgtagtta atcaagcggg taatacaagt gcgcctagaa tgagagcatt tagtttagcg     540
gcagtagctg cagatgcacc ggcagctggc acagatatta cgaatcagtt gacgaatgtg     600
acagttggta ttgactctgg tacgactgtg tatccgcacc aagcagggtta tgtcaaactg     660
aattatgggt tttcagtgcc taattctgct gttaaagggt acacattcaa aataactgta     720

```

```

cctaaagaat taaacttaaa tgggtgtaact tcaactgcta aagtgccacc aattatggct 780
ggagatcaag tattggcaaa tgggtgtaatc gatagtgatg gtaatgttat ttatacattt 840
acagactatg taaatactaa agatgatgta aaagcaactt tgaccatgcc cgcttatatt 900
gaccttgaaa atgttaaaaa gacaggtaat gtgacattgg ctactggcat aggtagtaca 960
acagcaaaca aaacagtatt agtagattat gaaaaatatg gtaagtttta taacttatct 1020
attaaaggta caattgacca aatcgataaa acaaataata cgtatcgtca gacaatttat 1080
gtcaatccaa gtggagataa cgttattgcg cgggttttaa caggtaattt aaaaccaa 1140
acggatagta atgcattaat agatcagcaa aatacaagta ttaaagtata taaagtagat 1200
aatgcagctg atttatctga aagttacttt gtgaatccag aaaactttga ggatgtcact 1260
aatagtgtga atattacatt cccaaatcca aatcaatata aagtagagtt taatacgctt 1320
gatgatcaaa ttacaacacc gtatatagta gttgttaatg gtcattatga tccgaatagc 1380
aaaggtgatt tagctttacg ttcaacttta tatgggtata actogaatat aatttggcgc 1440
tctatgtcat gggacaacga agtagcattt aataacggat caggttcttg tgacggtatc 1500
gataaaccag ttgttctga acaacctgat gagcctggtg aaattgaacc aattccagag 1560

```

<210> 2

<211> 520

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 2

```

Ser Glu Asn Ser Val Thr Gln Ser Asp Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys
1             5             10             15

Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr
20             25             30

Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Ser Ser Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr
35             40             45

Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser
50             55             60

Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr
65             70             75             80

```

Thr Thr Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn
 85 90 95

Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln Thr Ser Asn Glu Thr Thr Phe
 100 105 110

Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr
 115 120 125

Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr
 130 135 140

Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln Ser Thr Asp Ala Ser Asn Lys
 145 150 155 160

Asp Val Val Asn Gln Ala Val Asn Thr Ser Ala Pro Arg Met Arg Ala
 165 170 175

Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp
 180 185 190

Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr
 195 200 205

Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe
 210 215 220

Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val
 225 230 235 240

Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro
 245 250 255

Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser
 260 265 270

Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp
 275 280 285

Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn
 290 295 300

Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr
 305 310 315 320
 Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe
 325 330 335
 Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn
 340 345 350
 Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val
 355 360 365
 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn
 370 375 380
 Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp
 385 390 395 400
 Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe
 405 410 415
 Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln
 420 425 430
 Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr
 435 440 445
 Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu
 450 455 460
 Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg
 465 470 475 480
 Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser
 485 490 495
 Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro
 500 505 510
 Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
 515 520

<210> 3
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*
 <400> 3

```

gtagctgcag atgcacggc agctggcaca gatattacga atcagttgac gaatgtgaca      60
gttgggtattg actctgggtac gactgtgtat ccgcaccaag caggttatgt caaactgaat    120
tatgggttttt cagtgcctaa ttctgctgtt aaagggtgaca cattcaaaat aactgtacct    180
aaagaattaa acttaaattg tgtaacttca actgctaaag tgccaccaat tatggctgga     240
gatcaagtat tggcaaattg tgtaatcgat agtgatggta atgttattta tacatttaca     300
gactatgtaa atactaaaga tgaagtataa gcaactttga ccatgcccg cttatattgac     360
cctgaaaatg ttaaaaagac aggtaatgtg acattggcta ctggcatagg tagtacaaca     420
gcaaacaaaa cagtattagt agattatgaa aaatatggta agttttataa cttatctatt     480
aaagggtacaa ttgaccaaat cgataaaaca aataatacgt atcgtcagac aatttatgtc     540
aatccaagtg gagataacgt tattgcgcgc gttttaacag gtaatttaaa accaaatacg     600
gatagtaatg catataatga tcagcaaat acaagtatta aagtatataa agtagataat     660
gcagctgatt tatctgaaag ttactttgtg aatccagaaa actttgagga tgtcactaat     720
agtgtgaata ttacattccc aaatccaaat caatataaag tagagttaa tacgcctgat     780
gatcaaatta caacaccgta tatagtagtt gttaattggc atattgatcc gaatagcaaa     840
ggtgatttag ctttacgttc aactttatat ggggtataact cgaatataat ttggcgctct     900
atgtcatggg acaacgaagt agcatttaat aacggatcag gttctgggtga cggtatcgat     960
aaaccagttg ttctgaaca acctgatgag                                     990

```

<210> 4

<211> 331

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 4

```

Met Val Ala Ala Asp Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln
1           5           10           15

```

```

Leu Thr Asn Val Thr Val Gly Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro
          20           25           30

```

His Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe Ser Val Pro Asn
 35 40 45

Ser Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu
 50 55 60

Asn Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala
 65 70 75 80

Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val
 85 90 95

Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp Asp Val Lys Ala
 100 105 110

Thr Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Lys Lys Thr
 115 120 125

Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr Thr Ala Asn Lys
 130 135 140

Thr Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe Tyr Asn Leu Ser
 145 150 155 160

Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg
 165 170 175

Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Ile Ala Pro Val
 180 185 190

Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn Ala Leu Ile Asp
 195 200 205

Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp Asn Ala Ala Asp
 210 215 220

Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe Glu Asp Val Thr
 225 230 235 240

Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln Tyr Lys Val Glu
 245 250 255

Phe Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val
 260 265 270

Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser
 275 280 285

Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp
 290 295 300

Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile
 305 310 315 320

Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu
 325 330

<210> 5

<211> 336

<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 5

aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact	60
atgagctgta agtccagtc aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc	120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtcctct aaactactga tctactgggc atccactagg	180
gaatctgggt tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc	240
atcaacagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcataata cctctctcg	300
cacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa	336

<210> 6

<211> 112

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 6

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35	40	45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
50	55	60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
65	70	75
Ile Asn Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln		
85	90	95
Tyr Leu Ser Ser His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110

<210> 7
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 7

caggtgcatc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc	60
acatgcactg tctctggatt ctcatatcc agatataata tacactgggt tgcgcagcct	120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatgggggt gtgaaaacac agactataat	180
tcagctotca aatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttctta	240
aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccag cgcctactat	300
ggtaactcct ggtttgctta ctggggccag gggactctgg tcaactgtctc tgca	354

<210> 8
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 8

Gln Val His Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln	
1	5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr	
20	25 30
Asn Ile His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu	
35	40 45

Gly Met Ile Trp Gly Gly Glu Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Ser Ala Tyr Tyr Gly Asn Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 9
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 9
 aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact 60
 atgagctgta agtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc 120
 tgggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180
 gaatctggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc 240
 atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcataata cctctctcgc 300
 tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 10
 Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35	40	45
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
50	55	60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
65	70	75
		80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln		
85	90	95
Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110

<210> 11
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 11

cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc	60
acatgcgcta totctgggtt ctcattatcc agatatagtg tacactgggt tgcgcagcct	120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatggggtg gtggaaacac agactataat	180
tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttctta	240
aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtatt actgtgccag aaaaggggaa	300
ttctactatg gttacgacgg gtttgtttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct	360
gca	363

<210> 12
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Staphylococcus aureus*

<400> 12

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln	
1	15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Ala Ile Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr	
20	30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Lys Gly Glu Phe Tyr Tyr Gly Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 13

<211> 336

<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 13

aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact	60
atgagctgta ggtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc	120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aactgctga tctactgggc atccactagg	180
gaatctggtg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc	240
atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcacataa cctctctctg	300
tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaa	336

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 14

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Thr Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 15

<211> 354

<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 15

cagggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcac cctcacagag cctgtccatc 60
acatgcactg tctctgggtt ctcattatcc agatatagtg tacactgggt tcgccagcct 120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatggggtg gtggaaacac agactataat 180
tcagctctca aatccagact gagcatcacc aaggacaact ccaagagcca agttttctta 240
aaaatgaaca gtctgcaaac tgatgacaca gccatgtact actgtgccac cgcctactat 300
ggtaactcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc tgca 354

<210> 16

<211> 118

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 16

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Tyr
20 25 30

Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Thr Ala Tyr Tyr Gly Asn Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 17

<211> 336

<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 17

gacattgtga tgacacagtc gccagactct ctggctgtgt ctctgggaga aagggtcact	60
atgaactgta agtccagtc aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc	120
tgggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg	180
gaatctggtg tccctgatcg cttcagcggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc	240
atcagcagtg tacaagctga agacctggca gtttattact gtcatcaata cctctcctcg	300
tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaa	336

<210> 18

 $\langle 211 \rangle$ 112

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95
 Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 19

<211> 363

<212> ADN

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 19

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtgaagc cctcacagac cctgtccatc 60
 acatgcacca tctctgggtt ctcattatcc agatatagtg tacactgggt tcgccagcct 120
 ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaatg atatggggtg gtggaaacac agactataat 180
 tcagctctca aatccagact gagcatcagc aaagacaact ccaagaacca agttttctta 240
 aaaatgaaca gtctgaccgc cgctgacaca gccgtgtatt actgtgccag aaaaggggaa 300
 ttctactatg gttacgacgg gtttgtttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct 360
 tcc 363

<210> 20

<211> 121

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 20

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Ile	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Arg	Tyr
			20					25						30	
Ser	Val	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu
		35					40					45			
Gly	Met	Ile	Trp	Gly	Gly	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys
	50					55					60				
Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Gln	Val	Phe	Leu
65					70					75					80
Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Lys	Gly	Glu	Phe	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Asp	Gly	Phe	Val	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115				120								

Lisboa, 2011-12-13

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal que se liga ao subdomínio de ligação Clf33 da proteína ClfA de *S. aureus*, onde o referido anticorpo monoclonal é o anticorpo monoclonal 12-9 possuindo

(i) uma sequência leve variável codificada por uma sequência de ácido nucleico seleccionada entre o grupo consistindo de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:17 e seus degenerados; e

(ii) uma cadeia pesada variável codificada por uma sequência de ácido nucleico seleccionada entre o grupo consistindo de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 19 e seus degenerados.

2. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 1, onde o referido anticorpo trata ou previne uma infecção por *S. aureus* num humano ou animal.

3. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 1, onde o referido anticorpo inibe a ligação de bactérias estafilocócicas a fibrinogénio ou fibrina.

4. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 1, onde o referido anticorpo é adequado para administração parentérica, oral, intranasal, subcutânea, por aerossol ou intravenosa num humano ou animal.

5. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 1 onde o anticorpo monoclonal é de um tipo seleccionado entre o grupo consistindo de anticorpos monoclonais de murino, quimérico, humanizado e humano.

6. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 1 onde o anticorpo é um anticorpo monoclonal de cadeia simples.

7. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 1 que é criado contra uma proteína possuindo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:4.

8. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 7 onde a proteína tem uma sequência de aminoácidos codificada por uma

sequência de ácido nucleico de acordo com a SEQ ID NO:3, ou seus degenerados.

9. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 1 possuindo uma cadeia leve variável seleccionada entre o grupo consistindo de SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:18.

10. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 1 possuindo uma cadeia pesada variável seleccionada entre o grupo consistindo de SEQ ID NO:12 e SEQ ID NO:20.

11. Antissoros contendo um anticorpo de acordo com a Reivindicação 1.

12. *Kit* de diagnóstico compreendendo um anticorpo de acordo com a Reivindicação 1 e meios para detectar a ligação por esse anticorpo.

13. *Kit* de diagnóstico de acordo com a Reivindicação 12 onde os referidos meios para detectar a ligação compreendem um marcador detectável que está ligado ao referido anticorpo.

14. Método de diagnóstico de uma infecção de *S. aureus* compreendendo adicionar um anticorpo de acordo com a Reivindicação 1 a uma amostra suspeita de estar infectada com *S. aureus*, e determinar se anticorpos se ligaram à amostra.

15. Composição farmacêutica para tratar ou prevenir uma infecção de *S. aureus* compreendendo uma quantidade eficaz do anticorpo da Reivindicação 1 e um veículo, transportador ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

16. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 1 para utilização no tratamento ou prevenção de uma infecção de *S. aureus* compreendendo administrar a um paciente humano ou animal uma quantidade eficaz do referido anticorpo.

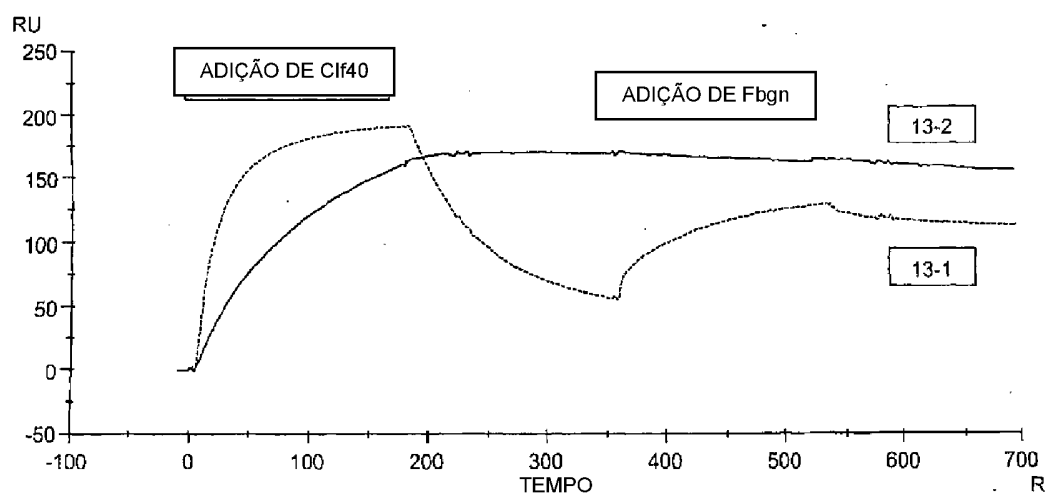
17. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 1 compreendendo adicionalmente um antibiótico fisiologicamente aceitável.

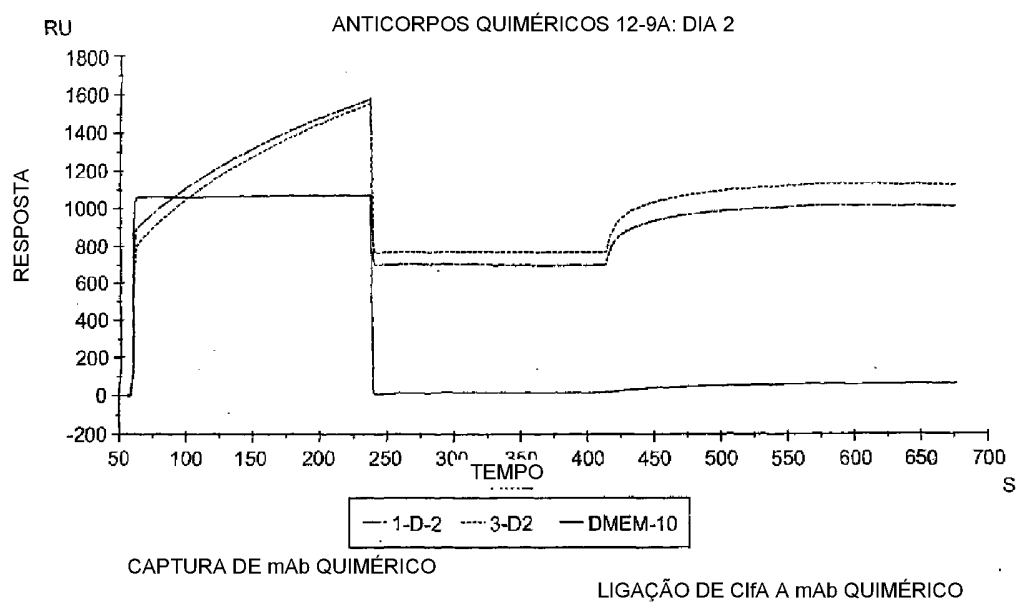
18. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 1 que é reactivo de modo cruzado com múltiplas estirpes de *S. aureus*.

19. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 1 que reconhece o domínio A da proteína ClfA de *S. aureus*.

20. Anticorpo de acordo com a Reivindicação 1 possuindo uma cadeia leve variável possuindo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO:10 e uma cadeia pesada variável possuindo a sequência de aminoácidos SEQ ID NO:12.

Lisboa, 2011-12-13

**FIG. 1**

**FIG. 2**

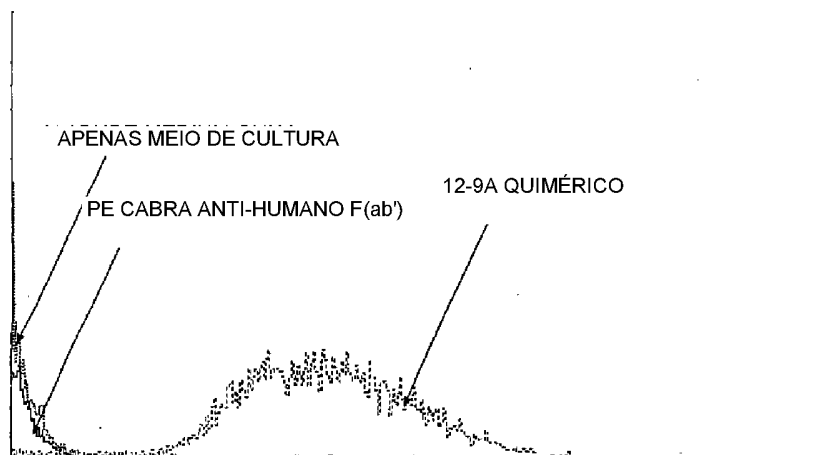
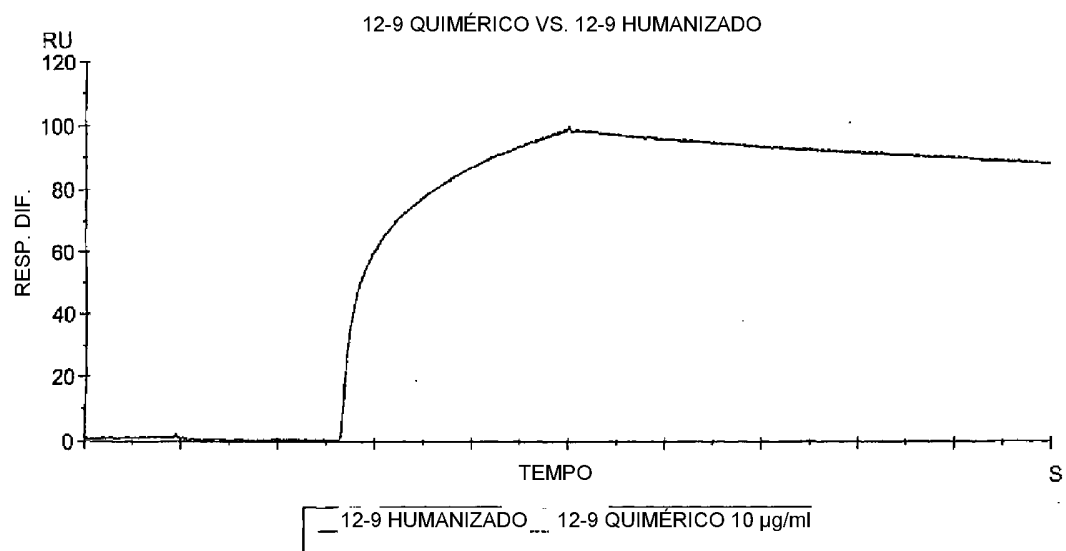
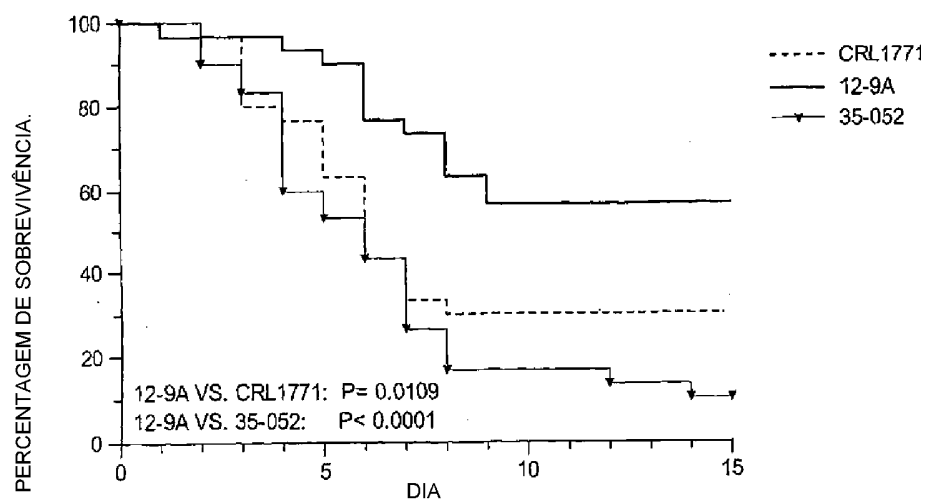
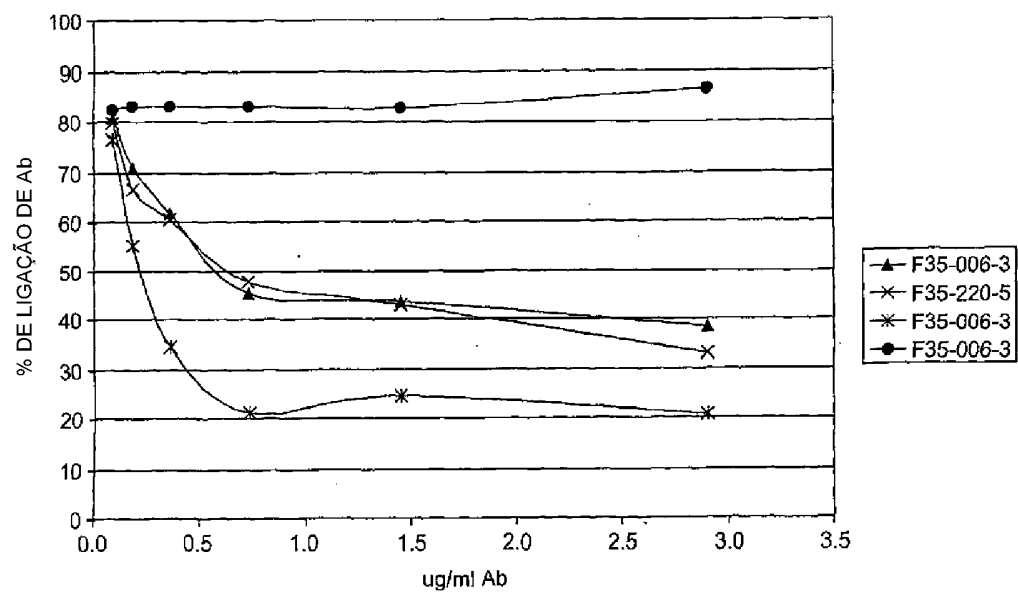
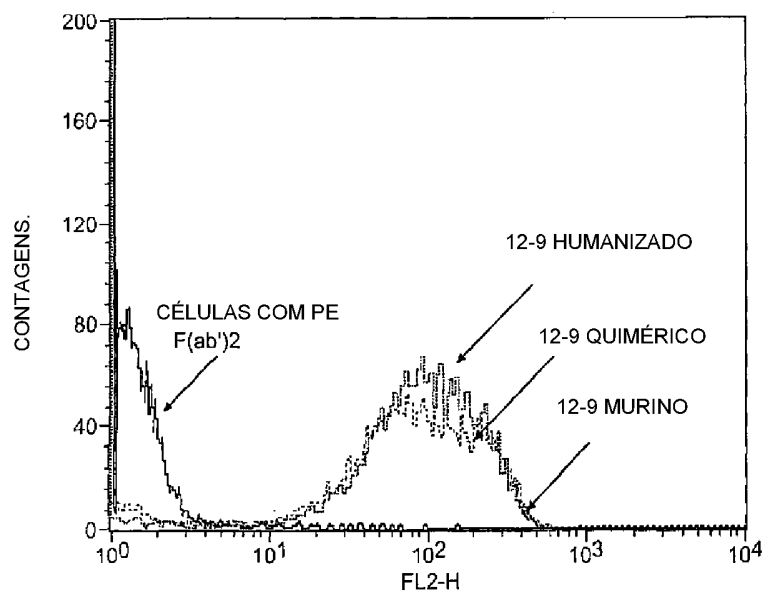


FIG. 3

**FIG. 4**

**FIG. 5**

**FIG. 6**

**FIG. 7**

CADEIA LEVE VARIÁVEL			
ANTICORPO	CDR 1	CDR 2	CDR 3
1771	LSSQSLLDSDGKTFLN	LVSKLDS	WQGTHFPYT
12-9 (C1A)	KSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQYLSSYT
13-2	KSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQYLSSHT
35-006	KSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQYLSSYT
35-220	RSSQSVLYSSNQKNYLA	WASTRES	HQYLSSYT
CONSENSO	KSSQSVLYSSNQKNYLA R	WASTRES	HQYLSSYT H
CADEIA LEVE VARIÁVEL			
ANTICORPO	CDR1	CDR2	CDR3
1771	SGFSWH	YIHYSGSTDCNPSLKS	MPDS
12-9 (C1A)	RYSVH	MIWGGGNTDYN SALKS	KGEFYYGYDGFVY
13-2	RYNIH	MIWGGGNTDYN SALKS	AYYGNSWFAY
35-006	RYSVH	MIWGGGNTDYN SALKS	RLWYFDV
35-220	RYSVH	MIWGGGNTDYN SALKS	AYYGNSWFAY
CONSENSO	RYSVH NI	MIWGGGNTDYN SALKS ES	AYYGNSWFA***Y KGEFYYGYD RLWYFDV

FIG. 8