

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA TRATAR Y PREVENIR
INFECCIONES POR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama prioridad sobre la solicitud de
5 patente provisional de EE. UU. número 62/007 242 presentada
el 3 de junio de 2014, la solicitud de patente provisional
de EE. UU. número 62/041 423 presentada el 25 de agosto de
2014 y la solicitud de patente provisional de EE. UU.
número 62/115 665 presentada el 13 de febrero de 2015.

10 LISTA DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene una Lista de Secuencias
que se ha presentado por vía electrónica en un formato
ASCII y se incorpora por la presente por referencia en su
totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 28 de mayo de 2015,
15 se denomina 5407-0234_SL.txt y tiene un tamaño de 83 036
bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere en general a métodos de
tratamiento médico, inmunología y microbiología. Más
20 especialmente, la invención se refiere a composiciones y
métodos para tratar y prevenir infecciones por
Staphylococcus aureus.

ANTECEDENTES

Staphylococcus aureus (SA) es una causa importante de
25 enfermedad y muerte tanto en seres humanos como en animales.
La infección con estos cocos grampositivos a menudo
conlleva el desarrollo de un absceso superficial. Otros
casos de infección por SA pueden ser mucho más graves. Por
ejemplo, la entrada de SA en la sangre y componentes
30 linfáticos puede conllevar una infección sistémica que, a
su vez, puede causar complicaciones tales como
endocarditis, artritis, osteomielitis, neumonía, choque
séptico e incluso la muerte. La infección por SA adquirida

en hospitales es común y especialmente problemática, siendo SA la causa más frecuente de infecciones del lecho quirúrgico y neumonías adquiridas en hospitales y la segunda causa más frecuente de infecciones cardiovasculares y del torrente sanguíneo. La administración de antibióticos ha sido y sigue siendo el tratamiento habitual para las infecciones por SA. Desafortunadamente, el uso de antibióticos también ha impulsado el desarrollo de resistencia a antibióticos en SA. De manera destacable, SA resistente a meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés) ha desarrollado la capacidad de resistir antibióticos betalactámicos tales como la penicilina y las cefalosporinas. De forma más alarmante, recientemente ha aparecido SA resistente a antibióticos de último recurso tales como la vancomicina y la linezolid. Así pues, se necesita una nueva estrategia para prevenir y tratar infecciones por SA.

COMPENDIO

Se ha descubierto que ciertos anticuerpos (Ab) que tienen parátomos de la región Fab que se unen específicamente a la proteína A de SA (SpA) son capaces de mediar la opsonización de las bacterias SA a pesar de la expresión por parte de SA de SpA que neutraliza anticuerpos (Ab). Las estrategias anteriores basadas en Ab para tratar o prevenir las infecciones por SA resultaron ser prometedoras en los ensayos preclínicos y clínicos en una etapa inicial, pero fracasaron a la hora de satisfacer los criterios de valoración en los ensayos de fase III. Algo que tal vez explique estos resultados es que las estrategias anteriores no tuvieron en cuenta la propiedad neutralizante de Ab de SpA. SpA es una proteína asociada con la pared celular expresada profusamente que se une a la mayoría de las inmunoglobulinas (Ig) mediante sus regiones

Fc (efectoras). SpA se une a los anticuerpos humanos de las subclases IgG1, IgG2 e IgG4 mediante su región Fc con una KD de aproximadamente 1×10^{-9} M y de esta manera actúa como un ancla de la región Fc que orienta la porción

5 efectora de una inmunoglobulina (Ig) de manera que se aleje de los efectores inmunitarios que interactúan con Fc tales como el complemento y los fagocitos que portan el receptor de Fc (FcR, por sus siglas en inglés). En consecuencia, la mayoría de los Ab específicos para los antígenos de SA son

10 "secuestrados" de los efectores inmunitarios de esta manera. Además, debido a que SpA está tan sumamente expresada en la pared celular de SA (7% estimado de la pared celular) media la formación de un escudo de Ig que cubren la pared celular. Este escudo impide estéricamente

15 que los Ab específicos para los antígenos de la pared celular se unan con sus dianas y medien la opsonofagocitosis de las bacterias. La formación de un escudo de Ig no se consideró previamente como un factor de virulencia. Por lo tanto, el descubrimiento de Ab que se unen a SA que tienen

20 regiones Fab que se unen específicamente a SpA a la vez que permiten que sus regiones Fc sigan interaccionando con los FcR de las células efectoras inmunitarias y/o activen el complemento al unirse a C1q a pesar de la capacidad neutralizante de Fc de SpA y la formación de un escudo de

25 Ig, fue un paso significativo respecto a otras estrategias contra SA basadas en anticuerpos. Las versiones preferidas de tales Ab son capaces de desplazar las Ig que ya están unidas a SpA mediante sus regiones Fc.

Como ejemplos de lo anterior, en la presente se

30 describen anticuerpos aislados o purificados (especialmente anticuerpos de tipo IgG3 humanas que tienen regiones Fc con una afinidad baja o nula por SpA, tal como uno con el alotipo que tiene arginina en la posición aminoacídica 435;

Stapleton *et al.*, *Nature Communications* 2, número de artículo: 599, 2011) que tiene regiones Fab que se pueden unir específicamente a un epítipo diana de SpA en una bacteria SA mientras sus regiones Fc todavía son capaces de interaccionar con un FcR (p. ej., natural o recombinante soluble en células efectoras inmunitarias) a pesar de la propiedad de unión a Fc de SpA y el impedimento estérico del epítipo diana que ejercen las Ig unidas a SpA mediante su región Fc. En la presente también se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen al menos uno de estos anticuerpos y un portador farmacéuticamente aceptable (p. ej., un portador no natural farmacéuticamente aceptable). Además se proporcionan métodos de tratamiento de un sujeto que padece una infección por SA o de reducción del riesgo de desarrollo de una infección por SA en un sujeto que incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente o cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente a un sujeto que lo necesite.

Tal como se utiliza en la presente, la palabra "un" o "uno" antes de un sustantivo representa uno o más del sustantivo concreto. Por ejemplo, la frase "un anticuerpo" representa "uno o más anticuerpos".

Mediante el término "anticuerpo" o "Ab" se hace referencia a cualquier inmunoglobulina (p. ej., anticuerpos humanos, de peces cartilaginosos o con material procedente de camellos) o conjugado de esta que se une específicamente a un antígeno (p. ej., un antígeno de SpA tal como la SEQ ID NO: 1 o un fragmento antigénico de la SEQ ID NO: 1). Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de Ab. Los ejemplos no limitantes de Ab incluyen: Ab monoclonales (p. ej., que incluyen Ab completos), Ab policlonales, Ab

multiespecíficos (p. ej., Ab biespecíficos), Ab con un dominio variable dual, Ab monocatenarios (p. ej., Ab con un único dominio, Ab de camélido y Ab de pez cartilaginoso), Ab quiméricos (p. ej., humanizados tales como IgG3 humanizada) y Ab humanos (p. ej., Ab de tipo IgG3 humana). El término anticuerpo también incluye conjugados de Ab (p. ej., un Ab conjugado con una proteína estabilizadora, una marca o un agente terapéutico (p. ej., cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en la presente o conocidos en la técnica)).

Mediante la expresión "fragmento de unión al antígeno" se hace referencia a cualquier porción de un Ab completo que contiene al menos un dominio variable ((p. ej., un dominio variable de una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina de mamífero (p. ej., humano, de ratón, rata, conejo o cabra), un dominio de unión al antígeno variable (VHH) de camélido o un dominio del receptor antigénico nuevo de una inmunoglobulina (Ig-NAR) de pez cartilaginoso) que es capaz de unirse específicamente a un antígeno. Por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede incluir al menos parte de una región Fc de Ab que es suficiente para mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés) en un mamífero (p. ej., un ser humano) y/o está conjugado con un agente terapéutico (p. ej., cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en la presente o conocidos en la técnica). Los ejemplos no limitantes de fragmentos de Ab incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales y Ab multiespecíficos formados a partir de fragmentos de Ab. Los fragmentos de Ab adicionales que contienen al menos un

dominio VHH de camélido o al menos un dominio Ig-NAR de pez cartilaginoso incluyen minicuerpos, microcuerpos, subnanocuerpos y nanoanticuerpos y cualquiera de las otras formas de Ab descritas en la publicación de la solicitud de
5 patente de EE. UU. N.º 2010/0092470. Un fragmento de unión al antígeno puede ser, p. ej., un fragmento de unión al antígeno de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM humana o humanizada.

Mediante la expresión "anticuerpo humano" se hace
10 referencia a un Ab que está codificado por un ácido nucleico (p. ej., locus de la cadena pesada o ligera de inmunoglobulinas humanas reorganizado) presente en el genoma de un ser humano. En algunas realizaciones, se produce un Ab humano en un cultivo de células de mamífero
15 (p. ej., humanas). En algunas realizaciones, se produce un Ab humano en una célula no humana (p. ej., una línea de células de ovario de hámster chino o una línea de células de ratón o hámster). En algunas realizaciones, se produce un Ab humano en una célula bacteriana o de levaduras. Un Ab
20 humano puede incluir un agente terapéutico conjugado (p. ej., cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en la presente o conocidos en la técnica). Un Ab humano puede ser una IgG1, IgG2, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM humana y es preferentemente una IgG3 humana. Mediante la expresión
25 "anticuerpo humano verdadero" se hace referencia a un Ab con regiones variables de la cadena pesada y ligera que están presentes de manera natural en el suero de un ser humano.

Mediante la expresión "anticuerpo humanizado" se hace
30 referencia a un Ab que contiene en su mayor parte secuencias de un Ab humano pero también incluye secuencias mínimas derivadas de una IgG no humana (p. ej., de ratón, rata, conejo o cabra). En los ejemplos no limitantes, los

Ab humanizados son Ab humanos (Ab receptor) en los cuales los residuos de la región hipervariable del Ab receptor son reemplazados por residuos de la región hipervariable de un Ab (Ab donante) de una especie no humana, p. ej., Ab de
5 ratón, rata, conejo o cabra que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunas realizaciones, los residuos de armazón de IgG humana son reemplazados por los correspondientes residuos no humanos. En algunas realizaciones, los Ab humanizados pueden contener residuos
10 que no se observan en el Ab receptor ni en el Ab donante. Estas modificaciones se pueden llevar a cabo para refinar más el rendimiento del Ab.

En algunas realizaciones, el Ab humanizado contendrá sustancialmente la totalidad de al menos uno y normalmente
15 dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables (regiones determinantes de la complementariedad) corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de armazón son las de una secuencia de
20 inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede contener al menos una porción de una región constante de Ig (región Fc), normalmente la de una Ig humana (p. ej., IgG3 humana). Los Ab humanizados se pueden producir mediante métodos de biología molecular que son muy
25 conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de métodos para generar Ab humanizados se describen en la presente. Un anticuerpo humanizado puede incluir un agente terapéutico conjugado (p. ej., cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en la presente o conocidos en la
30 técnica).

Mediante la expresión "anticuerpo monocatenario" se hace referencia a un único polipéptido que contiene al menos un dominio de unión variable (p. ej., un dominio

variable de una cadena pesada o ligera de Ig de mamífero, un dominio de unión al antígeno variable (VHH) de camélido o un dominio del receptor antigénico nuevo de una inmunoglobulina (Ig-NAR) de pez cartilaginoso (p. ej.,
5 tiburón)) que es capaz de unirse específicamente a un antígeno. Los ejemplos no limitantes de Ab monocatenarios se describen en la presente y son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, los anticuerpos descritos en la publicación de patente de EE. UU. N.º 2010/0092470). Un
10 anticuerpo con un único dominio puede incluir un agente terapéutico conjugado (p. ej., cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en la presente o conocidos en la técnica.

Un Ab o un fragmento de unión al antígeno de este “se
15 une específicamente” o “específicamente se une” a un antígeno concreto, p. ej., SpA (tal como un epítipo que comprende la SEQ ID NO: 1 o un fragmento antigénico de la SEQ ID NO: 1), cuando se une a ese antígeno pero reconoce y se une en menor medida (p. ej., no reconoce ni se une) a
20 otras moléculas en una muestra. En algunas realizaciones, un Ab o un fragmento de unión a antígeno de este se une selectivamente a un epítipo con una afinidad (K_D) igual o inferior a 1×10^{-10} M (p. ej., inferior a 1×10^{-11} M o inferior a 1×10^{-12} M) en solución salina tamponada con
25 fosfato (p. ej., según se determina mediante resonancia de plasmones superficiales). La capacidad de un Ab o un fragmento de unión al antígeno para unirse específicamente a un epítipo proteico se puede determinar utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica o
30 aquellos métodos descritos en la presente.

Mediante la expresión “región determinante de la complementariedad” o “CDR” se hace referencia a una región comprendida en una Ig (cadena pesada o ligera de Ig) que

forma parte de un sitio de unión al antígeno (parátopo) en un Ab o un fragmento de unión al antígeno de este. Tal como se sabe en la técnica, una cadena pesada de Ig contiene normalmente tres CDR: CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, y una cadena ligera de Ig contiene normalmente tres CDR: CDR1, CDR2 y CDR3. En cualquier Ab o fragmento de unión al antígeno de este, las tres CDR de la cadena pesada de Ig y las tres CDR de la cadena ligera de Ig juntas forman un sitio de unión al antígeno en el Ab o en el fragmento de unión al antígeno de este. La base de datos Kabat es un sistema utilizado en la técnica para numerar las secuencias de CDR presentes en una cadena ligera de Ig o una cadena pesada de Ig.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que le asigna normalmente un experto en la técnica a la cual esta invención pertenece. Los métodos y materiales se describen en la presente para su uso en la presente invención; también se pueden utilizar otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, secuencias, entradas de bases de datos y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un diagrama esquemático de SpA que muestra los diferentes dominios y la ubicación de cada uno de cinco péptidos antigénicos. Se muestra la secuencia del péptido antigénico n.º 5 (SEQ ID NO: 1).

La Figura 2 es un conjunto de dos gráficos que muestran un histograma de la fluorescencia del aislado clínico de SA 00X (parte superior) y de la cepa de SA ATCC n.º 25923 (parte inferior) incubados con un Ab PA8-G3 biotinilado (línea clara) o un Ab anti-interleucina-1alfa biotinilado de control (MABp1) (línea oscura) e incubados después con estreptavidina-APC.

La Figura 3 es un conjunto de dos gráficos que muestran un histograma de la fluorescencia del aislado clínico de 00X (parte superior) y de la cepa ATCC n.º 25923 (parte inferior) incubados con un Ab PA8-G3 no marcado (línea clara) o un Ab MABp1 no marcado (línea oscura), después con el receptor de Fc γ 1 recombinante biotinilado e incubados a continuación con estreptavidina-APC.

La Figura 4 es un gráfico de la intensidad fluorescente media de células HL60 diferenciadas (utilizando la clasificación de células por fluorescencia) tras una coincubación con el Ab PA8-G3 opsonizado con la cepa ATCC n.º 25923 o el aislado clínico 00X marcados con verde pH-rodo. Se utilizaron como control negativo muestras similares incubadas con un Ab MABp1 de control en lugar del Ab PA8-G3.

La Figura 5 es un conjunto de dos gráficos que muestra la intensidad de fluorescencia del aislado clínico 00X (parte superior) o ATCC n.º 25923 (parte inferior) preincubados con sueros humanos durante 15 minutos antes de la adición del Ab PA8-G3 o un Ab MABP1 de control negativo biotinilados e incubados a continuación con estreptavidina APC.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la intensidad de fluorescencia media de células HL-60 diferenciadas o no diferenciadas después de la coincubación con SA marcado con verde pH-rodo y uno de los siguientes Ab no marcados:

PA7.2-G3, PA4-G3, PA8-G3, PA15-G3, PA21-G3, PA27-G3, PA32-G3, PA37-G3 o MABp1. Se utilizaron como control negativo las muestras de Ab MABp1.

Las Figuras 7A-D son gráficos que muestran que la
5 administración del mAb PA8 favorece la supervivencia de sujetos murinos infectados con *S. aureus*.

Las Figuras 8A-C son gráficos que muestran la sinergia entre PA8-G3 y vancomicina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 En la presente se describen métodos y composiciones para tratar a un sujeto que padece una infección por SA o para reducir el riesgo de desarrollar una infección por SA en un sujeto.

Anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de estos

15 En la presente se describen Ab purificados o aislados (p. ej., al menos un 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% puros en peso) (p. ej., preferentemente IgG3 humanas verdaderas, humanas o humanizadas) que se unen a SpA y son capaces de mediar la opsonización de las bacterias SA a
20 pesar de la expresión por parte de SA de SpA que neutraliza anticuerpos (Ab). Tales Ab preferidos se unen al péptido de la SEQ ID NO: 1 con una afinidad de unión suficiente para desplazar las inmunoglobulinas IgG humanas (p. ej., una o más de IgG1, IgG2 e IgG4) unidas a SpA mediante su región
25 Fc. Los Ab preferidos se puede unir a SpA mediante sus parátomos de la región Fab con una K_D inferior a 1×10^{-10} M (p. ej., inferior a 1×10^{-11} M, inferior a 1×10^{-12} M, inferior a 0.5×10^{-12} M o inferior a 1×10^{-13} M) en condiciones fisiológicas (p. ej., solución salina tamponada
30 con fosfato) (p. ej., según se determina utilizando la resonancia de plasmones superficiales o la Interferometría Bio-Layer utilizando SpA recombinante). Por ejemplo, se prefieren los Ab descritos en la presente que se unen a SpA

mediante sus regiones Fab con una K_D comprendida entre 1×10^{-10} M y 0.5×10^{-12} M, entre 1×10^{-11} M y 0.5×10^{-12} M, entre 1×10^{-11} M y 0.2×10^{-12} M (p. ej., en condiciones fisiológicas, p. ej., solución salina tamponada con fosfato, p. ej., según se determina utilizando la resonancia de plasmones superficiales utilizando SpA recombinante). Aquellos Ab o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente preferentemente son capaces de desplazar Ab humanos (p. ej., una o más de IgG1, IgG2 e IgG4) unidos a SpA en la pared celular de una bacteria SA mediante sus regiones Fc. En la presente, también se proporcionan mAb purificados o aislados (p. ej., al menos un 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% puros en peso) (p. ej., preferentemente IgG3 humanas verdaderas, humanas o humanizadas) que se unen específicamente a la proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA) con una K_D inferior a 1×10^{10} M mediante sus parátomos de la región Fab, donde los mAb son capaces de mediar la opsonización de bacterias de *staphylococcus aureus* que expresan SpA en presencia de al menos 1 mg/mL (p. ej., al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50 o 100 mg/mL o la cantidad contenida normalmente en el suero humano) de inmunoglobulinas IgG que se unen a SpA mediante sus regiones Fc.

Los Ab purificados o aislados proporcionados en la presente puede que se unan a un epítipo presente en el dominio extracelular (p. ej., presente en la región X_R con repeticiones y uno o más de los dominios de unión a Ig) de SpA. Los ejemplos no limitantes de un antígeno que puede ser reconocido específicamente por cualquiera de los Ab (o fragmentos de unión al antígeno de estos) proporcionados en la presente incluyen: 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1 (p. ej., un fragmento que comienza en la posición

aminoacídica 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 de la SEQ ID NO: 1); 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 82 (p. ej., un fragmento que comienza en la posición aminoacídica 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 de la SEQ ID NO: 82); 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 83 (p. ej., un fragmento que comienza en la posición aminoacídica 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de la SEQ ID NO: 83); 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 84 (p. ej., un fragmento que comienza en la posición aminoacídica 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 de la SEQ ID NO: 84); 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 85 (p. ej., un fragmento que comienza en la posición aminoacídica 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 de la SEQ ID NO: 85); o 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos contiguos de las posiciones aminoacídicas 1-20, 10-30, 20-40, 30-50, 40-60, 50-70, 60-80, 70-90, 80-100, 90-110, 100-120, 110-130, 120-140, 130-150, 140-160, 150-170, 160-180, 170-190, 180-200, 190-210, 200-220, 210-230, 220-240, 230-250, 240-260, 250-270, 260-280, 270-290, 280-300, 290-310, 300-320, 310-330, 320-340, 330-350, 340-360, 350-370, 360-380, 370-390, 380-400, 390-410, 400-420, 410-430, 420-440 o 430 o hasta 450 de la SEQ ID NO: 86. Los ejemplos de otros antígenos incluyen fragmentos similares de SpA que tienen secuencias de aminoácidos diferentes de la SEQ ID NO: 86.

Los métodos para determinar la capacidad de un Ab o fragmento de unión al antígeno de este para unirse a una proteína diana (p. ej., SpA o una porción de este) se pueden llevar a cabo utilizando métodos conocidos en la

técnica. Los ejemplos no limitantes de tales métodos incluyen tecnología de ensayos de unión competitiva que utilizan Ab que se sabe que se unen a la proteína diana (p. ej., SpA), de ensayos de inmunoadsorción enzimática, 5 BioCoRE®, de columnas de afinidad, de inmunotransferencia o de matrices de proteínas. En algunas realizaciones, la actividad de unión del Ab o del fragmento de unión al antígeno de este se determina poniendo en contacto una bacteria SA con el Ab o el fragmento de unión al antígeno 10 de este. Los métodos a modo de ejemplo para determinar la capacidad de un Ab o fragmento de unión al antígeno para desplazar Ab humanos (p. ej., una o más de IgG1, IgG2 e IgG4) unidos a SpA en la pared celular de una bacteria SA se describen en la sección de Ejemplos más adelante. En la 15 técnica se conocen métodos adicionales para determinar la capacidad de un Ab o fragmento de unión al antígeno para desplazar Ab humanos (p. ej., una o más de IgG1, IgG2 e IgG4) unidos a SpA en la pared celular de una bacteria SA. Un Ab puede ser, p. ej., un mAb, un Ab multiespecífico (p. 20 ej., un Ab biespecífico), un Ab quimérico (p. ej., un Ab humanizado, tal como un Ab de tipo IgG humanizada), un Ab humano o un fragmento de cualquiera de los anteriores. Por ejemplo, un Ab puede ser un Ab de tipo IgG3 monoclonal humana o humanizada. Un Ab también puede ser un Ab 25 monocatenario (p. ej., un Ab con un único dominio), tal como un Ab de pez cartilaginoso (p. ej., tiburón) o de camélido monocatenario o un Ab monocatenario que contiene al menos un dominio de unión al antígeno variable (VHH) de camélido o al menos un dominio del receptor antigénico 30 nuevo de una inmunoglobulina (Ig-NAR) de pez cartilaginoso (p. ej., tiburón) (véase, por ejemplo, el anticuerpo descrito en la publicación de patente de EE. UU. N.º

2010/0092470). Un Ab puede ser una molécula de un Ab entero o un multímero de Ab.

El término Ab también incluye conjugados de Ab (p. ej., un Ab conjugado con una proteína estabilizadora, una
5 marca o un agente terapéutico (p. ej., cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en la presente o conocidos en la técnica)). Un Ab proporcionado en la presente puede, por ejemplo, incluir un dominio de Fc o una parte de un
10 dominio Fc que sea suficiente para mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de Ab (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en un mamífero (p. ej., un ser humano) y/o se conjuga con un agente terapéutico (p. ej., cualquiera de los agentes
15 terapéuticos descritos en la presente o conocidos en la técnica). Un Ab puede ser, p. ej., una IgG1, IgG2, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM humana o humanizada y es, preferentemente, una IgG3 humana o humanizada.

Un fragmento de unión al antígeno descrito en la presente puede incluir, p. ej., al menos parte de un
20 dominio Fc que sea suficiente para mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de Ab (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) en un mamífero (p. ej., un ser humano) y/o se conjuga con un agente terapéutico (p. ej., cualquiera de los agentes
25 terapéuticos descritos en la presente o conocidos en la técnica). Los ejemplos no limitantes de fragmentos de Ab incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv monocatenarios (scFv), Fv, fragmentos que contienen un dominio de la cadena ligera variable o pesada variable, diacuerpos, Ab
30 lineales y Ab multiespecíficos formados a partir de fragmentos de Ab. Los fragmentos de Ab adicionales que contienen al menos un dominio VHH de camélido o al menos un dominio Ig-NAR de pez cartilaginoso incluyen minicuerpos,

micro-Ab, subnano-Ab y nano-Ab y cualquiera de las otras formas de Ab descritas en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. N.º 2010/0092470.

Los Ab o fragmentos de unión al antígeno de estos
5 pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY humanas o humanizadas), clase (p. ej., IgG1 (p. ej., IgG1a o IgG1b), IgG2 (p. ej., IgG2a o IgG2b) IgG3 (p. ej., IgG3a o IgG3b), IgG4 (p. ej., IgG4a o IgG4b), IgA1 e IgA2 o subclase, aunque se prefieren aquellos en los que la
10 afinidad de unión de Fc por SpA es baja (p. ej., que tienen una K_D superior a 1×10^{-7} M, 1×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 1×10^{-4} M o 1×10^{-3} M; o que tienen una K_D superior a la de SpA por la región Fc de una IgG1 humana) en condiciones fisiológicas (p. ej., solución salina tamponada con
15 fosfato) (p. ej., según se determina utilizando resonancia de plasmones superficiales utilizando SpA recombinante). Un fragmento de unión al antígeno puede ser, p. ej., un fragmento de unión al antígeno de una IgG1 (p. ej., IgG1a o IgG1b), IgG2 (p. ej., IgG2a o IgG2b), IgG4 (p. ej., IgG4a o
20 IgG4b), IgD, IgA (p. ej., IgA1 o IgA2), IgE o IgM humana o humanizada y es preferentemente un fragmento de una IgG3 (p. ej., IgG3a o IgG3b) humana o humanizada. Se pueden introducir mutaciones de aminoácidos en la región constante de estas subclases de IgG. Las mutaciones de aminoácidos
25 que se pueden introducir pueden ser, por ejemplo, aquellas que potencian la unión a los receptores de Fc (tal como se describe en, p. ej., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (11): 4005-4010, 2006; *MAbs* 1 86): 572-579, 2009; documentos US 2010/0196362; US 2013/0108623; US
30 2014/0171623; US 2014/0093496 y US 2014/0093959), o potencian o disminuyen la unión a FcRn (tal como se describe en, p. ej., *J. Biol. Chem.* 276 (9): 6591-

6604,2001; *Int. Immunol.* 18 (12): 1759-1769, 2006 y *J. Biol. Chem.* 281 (33): 23514-23524,2006).

Para producir un Ab biespecífico se asocian de manera heteróloga dos tipos de cadenas H. La tecnología de botón en ojal (*knobs-into-holes*) (tal como se describe en, p. ej., *J. Immunol. Methods* 248 (1-2): 7-15, 2001 y *J. Biol. Chem.* 285 (27): 20850-20859, 2010), la tecnología de repulsión electrostática (tal como se describe en, p. ej., el documento WO 06/106905), la tecnología SEEDbody (tal como se describe en, p. ej., *Protein Eng. Des. Sel.* 23 (4): 195-202, 2010) y similares se pueden utilizar para la asociación heteróloga de dos tipos de cadenas H mediante un dominio CH3. Cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente pueden ser aquellos con una cadena de azúcar modificada o deficiente. Los ejemplos de anticuerpos que tienen cadenas de azúcar modificadas incluyen los anticuerpos manipulados con una glucosilación (tal como se describe en p. ej., el documento WO 99/54342), anticuerpos con cadenas de azúcar defucosiladas (tal como se describe en, p. ej., los documentos WO 00/61739, WO 02/31140, WO 06/067847 y WO 06/067913) y anticuerpos que tienen una cadena de azúcar con GlcNAc bisecado (tal como se describe en, p. ej., el documento WO 02/79255). Los ejemplos conocidos de métodos para producir anticuerpos de tipo IgG deficientes en la cadena de azúcar incluyen el método de introducir una mutación a asparagina en la posición de la numeración EU 297 en la cadena pesada (*J. Clin. Pharmacol.* 50 (5): 494-506, 2010) y el método para producir IgG utilizando *E. coli* (*J. Immunol. Methods* 263 (1-2): 133-147, 2002 y *J. Biol. Chem.* 285 (27): 20850-20859, 2010). Además, la heterogeneidad que acompaña la delección de la lisina C-terminal en IgG y la heterogeneidad que acompaña el emparejamiento erróneo de enlaces disulfuro en la región

bisagra de IgG2 se puede reducir introduciendo delecciones/sustituciones de aminoácidos (tal como se describe en, p. ej., el documento WO 09/041613). Cualquiera de los Ab o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente incluye al menos uno (p. ej., uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis) aminoácidos (p. ej., un aminoácido añadido, insertado o sustituido, p. ej., no dentro de una CDR) que no están presentes en un Ab humano correspondiente. Cualquiera de los Ab o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente también pueden tener al menos un aminoácido eliminado (p. ej., en comparación con un Ab humano correspondiente), p. ej., una delección en el extremo N o C de una cadena ligera o pesada, o una delección de un aminoácido de un dominio constante (p. ej., dominio Fc).

Se puede utilizar SpA, o un fragmento de esta (p. ej., al menos 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1 (p. ej., que comienza en la posición aminoacídica 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de la SEQ ID NO: 1), o toda la SEQ ID NO: 1) como un inmunógeno para generar Ab utilizando técnicas estándar para la preparación de Ab monoclonales y policlonales. Los fragmentos de Ab se pueden generar a partir de Ab monoclonales utilizando métodos muy conocidos en la técnica.

Normalmente se utiliza un inmunógeno para preparar Ab inmunizando a un sujeto adecuado (p. ej., conejo, cabra, ratón u otro mamífero). Una preparación inmunógena apropiada puede contener, por ejemplo, un polipéptido expresado recombinantemente o sintetizado químicamente. La preparación puede incluir además un adyuvante, tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund o un agente inmunestimulador similar.

Como una alternativa a la preparación de hibridomas que secretan Ab monoclonales, se puede identificar un Ab monoclonal dirigido contra un polipéptido y aislarlo cribando una colección de inmunoglobulinas combinatorias recombinantes (p. ej., una colección de Ab presentados en fagos) con el polipéptido de interés. Los kits para generar y cribar colecciones presentadas en fagos están comercializados (p. ej., el Sistema de Anticuerpos en Fagos Recombinantes de Pharmacia, N.º de catálogo 27-9400-01; y el kit de Presentación en Fagos SurfZAP* de Stratagene, N.º de catálogo 240612). Además, se pueden consultar ejemplos de métodos y reactivos especialmente adecuados para su uso en la generación y cribado de una colección de Ab presentados en, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 5 223 409; en los documentos WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/2079; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; Fuschs *et al.*, *Bio/Technology* 9: 1370-1372, 1991; Hay *et al.*, *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85, 1992; Huse *et al.*, *Science* 246: 1275-1281, 1989; Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 12: 725-734, 1993.

Se describen métodos adicionales para aislar y secuenciar un Ab humano (p. ej., una IgG3 humana) que se une específicamente a un epítipo de SpA (p. ej., un epítipo ubicado o definido dentro del polipéptido de la SEQ ID NO: 1) en la sección de Ejemplos más adelante. Se describen métodos generales adicionales para preparar Ab y fragmentos de unión al antígeno en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. N.º 2011/0059085.

En algunas realizaciones, los Ab o fragmentos de unión al antígeno proporcionados en la presente son Ab humanos o humanizados (p. ej., Ab de tipo IgG3 humana o humanizada). En algunas realizaciones, un Ab humanizado es un Ab humano que se ha modificado para que contenga al menos una región

determinante de la complementariedad (CDR) presente en un Ab no humano (p. ej., un Ab de rata, ratón, conejo o cabra). En algunas realizaciones, un Ab humanizado o un fragmento de este puede contener las tres CDR de una cadena ligera de un Ab humano o no humano que se une específicamente a un epítipo de SpA (p. ej., un epítipo ubicado o definido dentro del polipéptido de la SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el Ab humanizado o un fragmento de este puede contener las tres CDR de una cadena pesada de un Ab humano o no humano que se une específicamente a un epítipo de SpA (p. ej., un epítipo ubicado o definido dentro del polipéptido de la SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el Ab humanizado o un fragmento de este puede contener las tres CDR de una cadena pesada y las tres CDR de una cadena ligera de un Ab monoclonal humano o no humano que se une específicamente a un epítipo de SpA (p. ej., un epítipo ubicado o definido dentro del polipéptido de la SEQ ID NO: 1).

Los Ab de la invención también pueden incluir formas multiméricas de Ab. Por ejemplo, los Ab de la invención pueden adoptar la forma de dímeros, trímeros o multímeros de orden superior de Ab de moléculas de inmunoglobulina monoméricas. Los dímeros de moléculas de inmunoglobulina completa o de los fragmentos $F(ab')_2$ son tetravalentes, mientras que los dímeros de fragmentos Fab o de moléculas de scFv son bivalentes. Los monómeros individuales dentro de un multímero de Ab pueden ser idénticos o diferentes, es decir, pueden ser multímeros de Ab heteroméricos u homoméricos. Por ejemplo, los Ab individuales dentro de un multímero pueden tener especificidades de unión idénticas o diferentes.

La multimerización de Ab se puede conseguir mediante la agregación natural de Ab o mediante técnicas de unión

química o recombinante conocidas en la técnica. Por ejemplo, un porcentaje de los preparados de Ab purificados (p. ej., moléculas de IgG1 purificadas) forman espontáneamente agregados proteicos que contienen homodímeros de Ab y otros multímeros de Ab de orden superior. Como alternativa, los homodímeros de Ab se pueden formar mediante técnicas de unión químicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar los agentes reticulantes heterobifuncionales que incluyen, sin carácter limitante, SMCC (4-(maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo) y SATA (S-acetiltioacetato de N-succinimidilo) (que se pueden adquirir de, por ejemplo, Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, IL)) para formar multímeros de Ab. Un protocolo a modo de ejemplo para la formación de homodímeros de Ab se proporciona en Ghetie *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:7509-7514, 1997). Los homodímeros de Ab se pueden convertir en homodímeros de Fab'₂ mediante la digestión con pepsina. Otra manera de formar homodímeros de Ab es mediante el uso del péptido T15 autófilo descrito en Zhao *et al.* (*J. Immunol.* 25:396-404, 2002).

Como alternativa, se pueden multimerizar los Ab mediante técnicas de ADN recombinante. IgM e IgA forman de manera natural multímeros de Ab mediante la interacción con el polipéptido de la cadena J madura. Las moléculas que no son IgA ni IgM, tales como las moléculas de IgG, se pueden manipular para que contengan el dominio de interacción de la cadena J de IgA o IgM, y de esta manera se confiere la capacidad de formar multímeros de orden superior a las moléculas que no son IgA ni IgM (véase, por ejemplo, Chintalacharuvu *et al.*, *Clin. Immunol.* 101:21-31, 2001 y Frigerio *et al.*, *Plant Physiol.* 123:1483-1494, 2000). Los dímeros de IgA se secretan de manera natural en el lumen de

los órganos recubiertos por mucosas. Esta secreción está mediada por la interacción de la cadena J con el receptor de IgA polimérica (pIgR) de las células epiteliales. Si la secreción de una forma de IgA de un Ab (o de un Ab modificado para que contenga un dominio de interacción de la cadena J) no se desea, se puede reducir en gran medida expresando la molécula de Ab asociada con una cadena J mutante que no interaccione bien con pIgR (Johansen *et al.*, *J. Immunol.*, 167:5185-192, 2001). Los dímeros de scFv también se pueden formar mediante técnicas recombinantes conocidas en la técnica; un ejemplo de la construcción de dímeros de scFv se proporciona en Goel *et al.* (*Cancer Res.* 60:6964-71, 2000). Los multímeros de Ab se pueden purificar utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluida, sin carácter limitante, la cromatografía de exclusión por tamaño.

Cualquiera de los Ab o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente se pueden conjugar con una molécula estabilizante (p. ej., una molécula que aumente la semivida del Ab o fragmento de unión al antígeno de este en un felino o en solución). Los ejemplos no limitantes de moléculas estabilizadoras incluyen: un polímero (p. ej., un polietilenglicol) o una proteína (p. ej., albúmina sérica, tal como albúmina sérica felina). Cualquiera de los Ab o fragmentos de unión al antígeno descritos en la presente se pueden conjugar con una marca (p. ej., un fluoróforo, un radioisótopo o una molécula luminiscente) o un agente terapéutico (p. ej., un agente citotóxico o un radioisótopo). En la solicitud de patente de EE. UU. N.º 2013/0224228 se describen métodos a modo de ejemplo para unir una marca o agente terapéutico a un Ab. Los ejemplos no limitantes de agentes citotóxicos incluyen un agente que se sabe que induce la muerte celular de un microbio (p. ej.,

una bacteria grampositiva tal como *Staphylococcus aureus*). Los ejemplos no limitantes de agentes citotóxicos que se pueden conjugar con cualquiera de los Ab o fragmentos de unión al antígeno proporcionados en la presente incluyen:

5 linezolid, eritromicina, mupirocina, ertapenem, doripenem, imipenem, cilastatina, meropenem, cefadroxil, cefazolina, cefalotin, cefalotina, cefalexina, ceflacor, cefamandol, cefoxitina, cefprozil, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoreno, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima,
10 ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftarolina fosamil, ceftobiprol, teicoplanina, vancomicina, televancina, clindamicina, lincomicina, daptomicina, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina,
15 meticilina, nafcilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V, piperacilina, penicilina G, temocilina, ticarcilina, bacitracina, colistina, polimixina B, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, gemifloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, ácido nalidíxico,
20 norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina, grepafloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, mafenida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfadiazina de plata, sulfadimetoxina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprim-sulfametoxazol,
25 sulfonamidocrisoidina, demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina y tetraciclina.

Por ejemplo, un Ab (p. ej., una IgG3 monoclonal humana o humanizada) o un fragmento de unión al antígeno de este (p. ej., un fragmento de una IgG3 monoclonal humana o
30 humanizada) proporcionado en la presente que se une específicamente a SpA puede incluir:

- 5 (i) una cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 2, 3 y 4, respectivamente, y/o una cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 7, 8 y 9, respectivamente;
- 10 (ii) una cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 12, 13 y 14, respectivamente, y/o una cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 17, 18 y 19, respectivamente;
- 15 (iii) una cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 22, 23 y 24, respectivamente, y/o una cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 27, 28 y 29, respectivamente;
- 20 (iv) una cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 32, 33 y 34, respectivamente, y/o una cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 37, 38 y 39, respectivamente;
- 25 (v) una cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 42, 43 y 44, respectivamente, y/o una cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 47, 48 y 49, respectivamente;
- 30 (vi) una cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 52, 53 y 54, respectivamente, y/o una cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 57, 58 y 59, respectivamente;
- (vii) una cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 62, 63 y 64, respectivamente, y/o una cadena ligera que

comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 67, 68 y 69, respectivamente;

- (viii) una cadena pesada que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 72, 73 y 74, respectivamente, y/o una cadena ligera que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NOs: 77, 78 y 79, respectivamente.

En algunos ejemplos, cualquiera de los Ab proporcionados en la presente tiene: una cadena pesada que incluye la SEQ ID NO: 6 y/o una cadena ligera que incluye la SEQ ID NO: 11 de Ab; una cadena pesada que incluye la SEQ ID NO: 16 y/o una cadena ligera que incluye la SEQ ID NO: 21 de Ab; una cadena pesada que incluye la SEQ ID NO: 26 y/o una cadena ligera que incluye la SEQ ID NO: 31 de Ab; una cadena pesada que incluye la SEQ ID NO: 36 y/o una cadena ligera que incluye la SEQ ID NO: 41 de Ab; una cadena pesada que incluye la SEQ ID NO: 46 y/o una cadena ligera que incluye la SEQ ID NO: 51 de Ab; una cadena pesada que incluye la SEQ ID NO: 56 y/o una cadena ligera que incluye la SEQ ID NO: 61 de Ab; una cadena pesada que incluye la SEQ ID NO: 66 y/o una cadena ligera que incluye la SEQ ID NO: 71 de Ab; o una cadena pesada que incluye la SEQ ID NO: 76 y/o una cadena ligera que incluye la SEQ ID NO: 81 de Ab.

En ejemplos adicionales, cualquiera de los Ab (p. ej., una IgG3 humana o humanizada) o fragmentos de unión al antígeno (p. ej., un fragmento de unión al antígeno de una IgG3 humana o humanizada) proporcionados en la presente puede que se unan a SpA con una K_D inferior a 1×10^{-10} M (p. ej., inferior a 1×10^{-11} M o inferior a 1×10^{-12} M) y/o ser capaz de desplazar Ab humanos (p. ej., una o más de IgG1, IgG2 e IgG4) unidos a SpA, donde el antígeno o el fragmento de unión al antígeno tiene un conjunto de seis CDR y tiene

no más de una, dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones de aminoácidos en total (p. ej., sustituciones de aminoácidos conservadoras) en el conjunto (el conjunto completo) de seis CDR seleccionadas a partir
5 del grupo constituido por:

- (i) las SEQ ID N0s: 2, 3, 4, 7, 8 y 9;
- (ii) las SEQ ID N0s: 12, 13, 14, 17, 18 y 19;
- (iii) las SEQ ID N0s: 22, 23, 24, 27, 28 y 29;
- (iv) las SEQ ID N0s: 32, 33, 34, 37, 38 y 39;
- 10 (v) las SEQ ID N0s: 42, 43, 44, 47, 48 y 49;
- (vi) las SEQ ID N0s: 52, 53, 54, 57, 58 y 59;
- (vii) las SEQ ID N0s: 62, 63, 64, 67, 68 y 69; o
- (viii) las SEQ ID N0s: 72, 73, 74, 77, 78 y 79.

Por ejemplo, un Ab (p. ej., una IgG3 humana o humanizada)
15 o un fragmento de unión al antígeno (p. ej., un fragmento de unión al antígeno de una IgG3 humana o humanizada) proporcionado en la presente puede incluir un conjunto de seis CDR que tiene no más de una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácidos en total en el conjunto (el
20 conjunto completo) de seis CDR de las SEQ ID N0s: 2, 3, 4, 7, 8 y 9. Por ejemplo, un Ab (p. ej., una IgG3 humana o humanizada) o un fragmento de unión al antígeno (p. ej., un fragmento de unión al antígeno de una IgG3 humana o humanizada) proporcionado en la presente puede comprender o
25 estar constituido por:

- (i) un conjunto de seis CDR de las SEQ ID N0s: 2, 3, 4, 7, 8 y 9;
- (ii) un conjunto de seis CDR de las SEQ ID N0s: 12, 13, 14, 17, 18 y 19;
- 30 (iii) un conjunto de seis CDR de las SEQ ID N0s: 22, 23, 24, 27, 28 y 29;

- (iv) un conjunto de seis CDR de las SEQ ID NOs: 32, 33, 34, 37, 38 y 39;
- (v) un conjunto de seis CDR de las SEQ ID NOs: 42, 43, 44, 47, 48 y 49;
- 5 (vi) un conjunto de seis CDR de las SEQ ID NOs: 52, 53, 54, 57, 58 y 59;
- (vii) un conjunto de seis CDR de las SEQ ID NOs: 62, 63, 64, 67, 68 y 69; o
- (viii) un conjunto de seis CDR de las SEQ ID NOs: 72, 73, 74, 77, 78 y 79.

En ejemplos adicionales, un Ab (p. ej., una IgG3 monoclonal humana o humanizada) o un fragmento de unión al antígeno (p. ej., un fragmento de unión al antígeno de una IgG3 humana o humanizada) proporcionado en la presente que se une específicamente a SpA incluye un dominio variable seleccionado a partir del grupo de: (i) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 5; (ii) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 10; (iii) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 15; (iv) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 20; (v) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 25; (vi) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 30; (vii) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 35; (viii) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 40; (iv) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 45; (x) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 50; (xi) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 55; (xii) un dominio variable que comprende o está constituido por la

SEQ ID NO: 60; (xiii) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 65; (xiv) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 70; (xv) un dominio variable que comprende o está
5 constituido por la SEQ ID NO: 75; o (xvi) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 80. Por ejemplo, un Ab (p. ej., una IgG3 monoclonal humana o humanizada) o un fragmento de unión al antígeno (p. ej., un fragmento de unión al antígeno de una IgG3 humana o
10 humanizada) puede incluir (i) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 5 y/o un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 10; (ii) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 15 y/o un dominio
15 variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 20; (iii) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 25 y/o un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 30; (iv) un dominio variable que comprende o está constituido por la
20 SEQ ID NO: 35 y/o un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 40; (v) un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 45 y/o un dominio variable que comprende o está constituido por la
SEQ ID NO: 50; (vi) un dominio variable que comprende o
25 está constituido por la SEQ ID NO: 55 y/o un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 60; (vii) un dominio variable que comprende o está
constituido por la SEQ ID NO: 65 y/o un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 70; o un
30 dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 75 y/o un dominio variable que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 80.

Algunas realizaciones de cualquiera de los Ab (p. ej., IgG3 monoclonal humana o humanizada) o fragmentos de unión al antígeno (p. ej., un fragmento de unión al antígeno de una IgG3 humana o humanizada) descritos en la presente
5 tienen una o más (p. ej., una, dos, tres o cuatro) de las siguientes actividades: se unen específicamente a SpA en una cepa de MRSA; se unen específicamente a un epítipo definido por la SEQ ID NO: 1; se unen a SpA con una K_D inferior a 1×10^{-10} M (p. ej., inferior a 1×10^{-11} M o
10 inferior a 1×10^{-12}); y desplazar Ab humanos unidos a SpA en la pared celular de una bacteria de *Staphylococcus aureus* (p. ej., una bacteria de MRSA).

Composiciones farmacéuticas

En la presente se proporcionan composiciones
15 farmacéuticas que contienen al menos un portador farmacéuticamente aceptable (p. ej., un portador no natural farmacéuticamente aceptable) y al menos uno (p. ej., dos, tres o cuatro) de cualquiera de los Ab o fragmentos de unión al antígeno proporcionados en la presente. Los
20 ejemplos no limitantes de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen agua esterilizada, solución salina fisiológica, estabilizantes, excipientes, antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico), tampones (p. ej., fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos), antisépticos,
25 surfactantes (p. ej., PEG y Tween), agentes quelantes (p. ej., EDTA o EGTA) y aglutinantes. Los ejemplos adicionales de portadores farmacéuticamente aceptables también incluyen polipéptidos con un bajo peso molecular, proteínas (p. ej., albúmina sérica y gelatina), aminoácidos (p. ej., glicina,
30 glutamina, asparagina, ácido glutámico, ácido asparágico, metionina, arginina y lisina), azúcares y carbohidratos (p. ej., polisacáridos y monosacáridos) y alditoles (p. ej., manitol y sorbitol). Cuando se prepara una solución acuosa

para inyección, se pueden utilizar solución salina fisiológica y soluciones isotónicas que comprenden glucosa y otros adyuvantes tales como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio y, si es necesario, combinados
5 con solubilizantes apropiados, tales como alcohol (p. ej., etanol), polialcoholes (p. ej., propilenglicol y PEG) y surfactantes no iónicos (p. ej., polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 188 y HCO-50). Mezclando hialuronidasa en la formulación, se puede administrar un
10 volumen del fluido más grande por vía subcutánea (véase, p. ej., *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 4(4):427-440, 2007).

Los Ab y fragmentos de unión al antígeno proporcionados en la presente pueden, p. ej., estar encapsulados en microcápsulas (p. ej., aquellas hechas con
15 hidroximetilcelulosa, gelatina y poli(metacrilato de metilo)) o incorporados como componentes de sistemas de suministro de fármacos coloidales (p. ej., liposomas, microesferas de albúmina, microemulsión, nanopartículas u nanocápsulas) (véase, por ejemplo, "Remington's
20 Pharmaceutical Science, 16.^a edición", Oslo Ed. (1980)). Los métodos para preparar las composiciones farmacéuticas como agentes farmacéuticos de liberación controlada son también muy conocidos y tales métodos se pueden aplicar a los Ab y fragmentos de unión al antígeno de la presente
25 invención (véase, p. ej., Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 267-277, 1981; Langer, *Chemtech.* 12: 98-105, 1982; patente de EE. UU. N.º 3 773 919; publicación de la solicitud de patente europea N.º EP 58 481; Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22: 547-556, 1983 y el documento EP 133 988).

30 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente se pueden formular para la administración intravenosa, intraarterial, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal u oral.

La dosis de una composición farmacéutica de la presente invención se puede determinar de manera adecuada teniendo en cuenta la forma farmacéutica, método de administración, edad y peso corporal del paciente, síntomas
5 del paciente, gravedad de la infección por SA o nivel de riesgo de la infección por SA. Por lo general, la dosis diaria para un adulto puede estar comprendida, p. ej., entre 0.1 mg y 10 000 mg en una toma o en varias porciones. La dosis puede estar comprendida, p. ej., entre 0.2 y 10
10 000 mg/día (p. ej., 1-10 g/día, 2-8 g/día, 1-5 g/día, entre 0.5 y 2.5 g/día, entre 0.5 y 500 mg/día, entre 1 y 300 mg/día, entre 3 y 100 mg/día o entre 5 y 50 mg/día). Estas dosis pueden variar dependiendo del peso corporal y edad del paciente y del método de administración; sin embargo,
15 la selección de la dosificación adecuada está sobradamente comprendida en las competencias del experto en la técnica. De manera similar, el periodo posológico se puede determinar de manera adecuada dependiendo del progreso terapéutico.

20 Cualquiera de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente puede incluir además uno o más agentes antimicrobianos adicionales. Los ejemplos no limitantes de tales agentes antimicrobianos incluyen: linezolida, eritromicina, mupirocina, ertapenem, doripenem,
25 imipenem, cilastatina, meropenem, cefadroxil, cefazolina, cefalotin, cefalotina, cefalexina, ceflacor, cefamandol, cefoxitina, cefprozil, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoreno, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona,
30 ceftarolina fosamil, ceftobiprol, teicoplanina, vancomicina, televancina, clindamicina, lincomicina, daptomicina, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina,

meticilina, nafcilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V, piperacilina, penicilina G, temocilina, ticarcilina, bacitracina, colistina, polimixina B, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, gemifloxacina, levofloxacina, 5 lomefloxacina, moxifloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina, grepafloxacina, esparfloxacina, temafloxacina, mafenida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfadiazina de plata, sulfadimetoxina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfanilamida, sulfasalazina, 10 sulfisoxazol, trimetoprim-sulfametoxazol, sulfonamidocrisoidina, demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitettraciclina y tetraciclina.

Métodos de tratamiento de un sujeto que padece una infección por *S. aureus* o de reducción del riesgo de 15 desarrollo de una infección por *S. aureus* en un sujeto

También se proporcionan métodos de tratamiento de un sujeto que padece una infección por SA (p. ej., una infección por MRSA, una bactericemia por SA, una infección de la piel por SA, mastitis por SA, celulitis o foliculitis 20 por SA o infecciones de heridas, abscesos, osteomielitis, endocarditis, neumonía, choque séptico, intoxicación alimentaria o síndrome del choque tóxico en los que participa SA) que incluyen administrar a un sujeto (p. ej., a un ser humano o a otro mamífero tal como un animal bovino, 25 ovino, canino, felino, equino, caprino, de tipo conejo o liebre, porcino o aviar) que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una de cualquiera de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente o al menos uno de cualquiera de los Ab o 30 fragmentos de unión al antígeno proporcionados en la presente. En algunos ejemplos, se ha diagnosticado o identificado que el sujeto padece una infección por SA (p. ej., una infección por MRSA). Algunas realizaciones

incluyen además (antes del paso de administración) un paso de diagnóstico, identificación o selección del sujeto que padece o como uno que padece una infección por SA (p. ej., una infección por MRSA o VRSA). En algunos ejemplos, la
5 infección por SA es una infección hospitalaria. En algunos ejemplos, el sujeto ha sido tratado previamente con un tratamiento antibacteriano y el tratamiento anterior no tuvo éxito.

También se proporcionan métodos para reducir el riesgo
10 de un sujeto de desarrollar una infección por SA (p. ej., una infección por MRSA) que incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos una de cualquiera de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente o al menos uno de cualquiera de los Ab o fragmentos de unión
15 al antígeno proporcionados en la presente. En algunas realizaciones, la infección por SA es una infección hospitalaria. Algunas realizaciones incluyen además antes de la administración, la selección o identificación de un sujeto que presenta un mayor riesgo de desarrollar una
20 infección por SA (p. ej., una infección por MRSA). Por ejemplo, el sujeto puede ser un profesional médico (p. ej., un médico, una enfermera, un técnico de laboratorio o un auxiliar médico) (p. ej., un profesional médico en contacto físico con un sujeto que padece una infección por SA (p.
25 ej., una infección por MRSA)). Un sujeto en estos métodos también puede ser un sujeto admitido en un hospital o un centro para tratamiento (p. ej., una residencia de ancianos) que contiene (ha admitido) al menos a un sujeto que padece una infección por SA (p. ej., una infección por MRSA). El
30 sujeto puede ser un paciente hospitalizado tal como uno en la unidad de cuidados intensivos, un paciente inmunocomprometido y un paciente que se ha sometido o que

se someterá a un procedimiento quirúrgico (p. ej., cirugía cardíaca).

En cualquiera de los métodos proporcionados en la presente, el sujeto puede ser un hombre o una mujer. Por ejemplo, el sujeto puede ser un lactante, un niño pequeño, un adolescente, un joven o un adulto (p. ej., de al menos 18 años de edad, al menos 20 años de edad, al menos 25 años de edad, al menos 30 años de edad, al menos 35 años de edad, al menos 40 años de edad, al menos 45 años de edad, al menos 50 años de edad, al menos 55 años de edad, al menos 60 años de edad, al menos 65 años de edad, al menos 70 años de edad, al menos 75 años de edad, al menos 80 años de edad, al menos 85 años de edad, al menos 90 años, al menos 95 años de edad o al menos 100 años de edad). En algunos ejemplos, el sujeto tiene un sistema inmunitario suprimido o debilitado (p. ej., sistema inmunitario humoral o celular).

En algunos ejemplos, la composición o las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente o el Ab o los Ab o el fragmento o los fragmentos de unión al antígeno proporcionados en la presente se administran mediante administración intravenosa, intraarterial, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal u oral. Por ejemplo, en los métodos de reducción del riesgo de desarrollo de una infección por SA, al sujeto se le administra al menos una de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente o al menos uno de los Ab o fragmentos de unión al antígeno proporcionados en la presente antes o poco después de entrar en contacto físico con un sujeto identificado, diagnosticado, que padece o que se sospecha que padece una infección por SA (p. ej., una infección por MRSA).

En cualquiera de los métodos descritos en la presente, al sujeto se le administran al menos una (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) dosis de cualquiera de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente o al menos una (p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez) dosis de cualquiera de los Ab o fragmentos de unión al antígeno proporcionados en la presente. Al sujeto se le pueden administrar dos o más dosis de cualquiera de las composiciones farmacéuticas o al menos dos dosis de cualquiera de los Ab o fragmentos de unión al antígeno proporcionados en la presente con una frecuencia de al menos una dosis cada mes (p. ej., al menos dos dosis cada mes, al menos tres dosis cada mes, al menos cuatro dosis cada mes, al menos una dosis a la semana, al menos dos dosis a la semana, al menos tres dosis a la semana, al menos cuatro dosis a la semana, al menos cinco dosis a la semana, al menos una dosis al día, al menos dos dosis al día o al menos tres dosis al día).

Algunas realizaciones incluyen además coadministrar a un sujeto un Ab descrito en la presente y uno o más agentes antimicrobianos adicionales. Los ejemplos no limitantes de tales agentes antimicrobianos incluyen: linezolida, eritromicina, mupirocina, ertapenem, doripenem, imipenem, cilastatina, meropenem, cefadroxil, cefazolina, cefalotin, cefalotina, cefalexina, ceflacor, cefamandol, cefoxitina, cefprozil, cefuroxima, cefixima, cefdinir, cefditoreno, cefoperazona, cefotaxima, cefpodoxima, ceftazidima, ceftibuteno, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftarolina fosamil, ceftobiprol, teicoplanina, vancomicina, televancina, clindamicina, lincomicina, daptomicina, amoxicilina, ampicilina, azlocilina, carbenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, flucloxacilina, mezlocilina, meticilina,

nafcilina, oxacilina, penicilina G, penicilina V, piperacilina, penicilina G, temocilina, ticarcilina, bacitracina, colistina, polimixina B, ciprofloxacin, enoxacin, gatifloxacin, gemifloxacin, levofloxacin, 5 lomefloxacin, moxifloxacin, ácido nalidíxico, norfloxacin, ofloxacin, trovafloxacin, grepafloxacin, esparfloxacin, temafloxacin, mafenida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfadiazina de plata, sulfadimetoxina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfanilamida, sulfasalazina, 10 sulfisoxazol, trimetoprim-sulfametoxazol, sulfonamidocrisoidina, demeclociclina, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina y tetraciclina. Algunos ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que se pueden incluir en cualquiera de las composiciones farmacéuticas 15 proporcionadas en la presente son uno o más Ab descritos en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. N.º 2011/0059085.

Kits

También se proporcionan en la presente kits que 20 contienen al menos uno (p. ej., dos, tres, cuatro o cinco) de cualquiera de los Ab o fragmentos de unión al antígeno proporcionados en la presente. En algunos ejemplos, los kits pueden contener una SpA recombinante o un péptido que comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 1 o un 25 fragmento antigénico de la SEQ ID NO: 1 (p. ej., al menos 7 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 1 (p. ej., que comienza en la posición aminoacídica 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 de la SEQ ID NO: 1)). En algunos ejemplos, el Ab o los Ab o el fragmento o los fragmentos de 30 unión al antígeno se unen a un sustrato sólido (p. ej., un pocillo, un chip, una película, una microesfera o una resina cromatográfica). Tales kits pueden incluir embalaje

comercial y/o información impresa sobre los Ab y métodos para su uso.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Generación de Ab humanos que se unen específicamente a SpA y desplazar las inmunoglobulinas IgG humanas unidas a SpA mediante su región Fc

Se generaron Ab de tipo IgG3 humana que se unen a un epítipo de SpA tal como se describe más adelante. Se utilizaron cinco péptidos sintetizados que abarcan las secuencias Xr con repeticiones y de unión a IgG en SpA para cribar y detectar Ab antipeptídicos en la sangre de 311 voluntarios adultos sanos. Los cinco péptidos de SpA sintetizados utilizados para el cribado tuvieron las secuencias indicadas como: SEQ ID NOs: 82, 83, 84, 85 y 1 (péptidos 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente). Aproximadamente un 4% de los sujetos sanos presentaron unos niveles de Ab antipeptídicos (anti-SpA) respecto a un fondo (denominado en la presente posteriormente "donantes positivos"), determinados según un ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), superiores a un valor aumentado 10 veces. Se obtuvo el plasma de estos donantes positivos y se utilizó para aislar Ab humanos verdaderos que se unen específicamente a un péptido que abarca las secuencias Xr con repeticiones y de unión a IgG de SpA utilizando los métodos descritos en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. N.º 2013/0018173. Resumiendo, se aislaron los Ab de interés utilizando cromatografía de afinidad por el antígeno y se secuenciaron *de novo* utilizando espectrometría de masas. En paralelo, se isotiparon los Ab utilizando un kit de isotipado humano. Se identificó que uno de los Ab aislados pertenecía a la subfamilia VH3 y tenía una cadena pesada de IgG2 y una cadena ligera de VK1. Se aislaron linfocitos B de la sangre

del donante utilizando un kit obtenido de STEMCELL Technologies, Inc. Se extrajo su ARN utilizando un protocolo de extracción Trizol y se generó ADNc utilizando SuperScript III. Se utilizaron cebadores específicos del
5 líder para amplificar las correspondientes cadenas pesada y ligera del Ab y se generó una colección de ScFv "dirigida". La colección se sometió a un proceso de enriquecimiento (*panning*) con el antígeno de SpA natural durante 7 ciclos. Los clones se cribaron utilizando ELISA directa y sándwich
10 con SpA natural. Los clones seleccionados se secuenciaron y las cadenas pesada y ligera se clonaron en vectores con una región constante (Fc) de IgG3 (una que carece del sitio de reconocimiento de SpA en las regiones Fab). Con los vectores se transfectaron líneas de células CHO y se
15 escogieron los clones con una producción elevada. Los Ab purificados se estudiaron para detectar su actividad anti-SpA. Los clones se escalaron para una producción a gran escala y los Ab producidos se purificaron y utilizaron para análisis posteriores. Los ejemplos de ocho de tales Ab se
20 describen a continuación:

Ab PA8-G3

Dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 5.
CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada de las SEQ ID NOs: 2,
3 y 4, respectivamente.
25 Cadena pesada de la SEQ ID NO: 6.
Dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:
10.
CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera de las SEQ ID NOs: 7,
8 y 9, respectivamente.
30 Cadena ligera de la SEQ ID NO: 11.

Ab PA4-G3

Dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:
15.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada de las SEQ ID NOs: 12, 13 y 14, respectivamente.

Cadena pesada de la SEQ ID NO: 16.

5 Dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 20.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera de las SEQ ID NOs: 17, 18 y 19, respectivamente.

Cadena ligera de la SEQ ID NO: 21.

Ab PA7.2-G3

10 Dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 25.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada de las SEQ ID NOs: 22, 23 y 24, respectivamente.

Cadena pesada de la SEQ ID NO: 26.

15 Dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 30.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera de las SEQ ID NOs: 27, 28 y 29, respectivamente.

Cadena ligera de la SEQ ID NO: 31.

20 **Ab PA15-G3**

Dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 35.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada de las SEQ ID NOs: 32, 33 y 34, respectivamente.

25 Cadena pesada de la SEQ ID NO: 36.

Dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 40.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera de las SEQ ID NOs: 37, 38 y 39, respectivamente.

30 Cadena ligera de la SEQ ID NO: 41.

Ab PA21-G3

Dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 45.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada de las SEQ ID NOs: 42, 43 y 44, respectivamente.

Cadena pesada de la SEQ ID NO: 46.

5 Dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 50.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera de las SEQ ID NOs: 47, 48 y 49, respectivamente.

Cadena ligera de la SEQ ID NO: 51.

Ab PA27-G3

10 Dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 55.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada de las SEQ ID NOs: 52, 53 y 54, respectivamente.

Cadena pesada de la SEQ ID NO: 56.

15 Dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 60.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera de las SEQ ID NOs: 57, 58 y 59, respectivamente.

Cadena ligera de la SEQ ID NO: 61.

20 **Ab PA32-G3**

Dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 65.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada de las SEQ ID NOs: 62, 63 y 64, respectivamente.

25 Cadena pesada de la SEQ ID NO: 66.

Dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 70.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera de las SEQ ID NOs: 67, 68 y 69, respectivamente.

30 Cadena ligera de la SEQ ID NO: 71.

Ab PA37-G3

Dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 75.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada de las SEQ ID NOs: 72, 73 y 74, respectivamente.

Cadena pesada de la SEQ ID NO: 76.

Dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 80.

CDR 1, 2 y 3 de la cadena ligera de las SEQ ID NOs: 77, 78 y 79, respectivamente.

Cadena ligera de la SEQ ID NO: 81.

Se llevó a cabo un conjunto de experimentos para determinar si el Ab PA8-G3 sería capaz de unirse a SpA en la pared celular de SA. En estos experimentos, se incubó la cepa de SA ATCC n.º 25923 o el aislado clínico 00X con (i) PA8-G3 biotinilado y posteriormente estreptavidina-APC para cuantificar por fluorescencia la cantidad de biotina-PA-G3 unida a la superficie de SA (Figura 2) o (ii) el AB PA8-G3 no marcado purificado, después con el receptor de Fc γ 1 recombinante biotinilado y a continuación con la estreptavidina-APC para cuantificar por fluorescencia la cantidad de PA8-G3 unido a la superficie de SA que daría lugar a la fagocitosis (es decir, que tiene regiones Fc libres disponibles para unirse al receptor de Fc γ 1 recombinante) (Figura 3). Se utilizó un Ab anti-interleucina-1a (MABp1) como control negativo en estos experimentos. Los datos de la Figura 2 muestran que PA8-G3 se une a SpA en la pared celular de SA y los datos de la Figura 3 indican que el Ab PA8-G3 unido tenía sus regiones Fc disponibles para interaccionar con FcR, lo que sugiere que el Ab sería capaz de mediar la opsonofagocitosis de SA en sujetos humanos (a diferencia del caso en el que tiene sus regiones Fc unidas a SpA y no es capaz de interaccionar con los FcR y mediar de esta manera la opsonofagocitosis de las bacterias).

Se llevó a cabo un conjunto adicional de experimentos para estudiar si la unión del Ab PA8-G3 a la superficie de SA sería reconocida por los receptores Fc γ de los fagocitos. En estos experimentos, se incubaron dos cepas diferentes de *S. aureus* marcadas con verde pH-rodo (aislado clínico 00X o ATCC n.º 25923) con el Ab PA8-G3 no marcado o un Ab de control (MABp1) y después se incubaron con células HL-60 diferenciadas. Se determinó la fluorescencia resultante de las células HL-60 utilizando la clasificación de células asistida por fluorescencia (FACS). Los datos muestran que PA8-G3 se une a la pared celular de ambas cepas de SA y media la fagocitosis mediante los receptores Fc γ en la superficie de las células HL-60 (Figura 4). La fagocitosis exitosa por parte de las células HL-60 diferenciadas de *S. aureus* unida a PA8-G3 también fue evidente a partir de los experimentos de microscopía con fluorescencia.

Se utilizó la resonancia de plasmones superficiales para determinar la cinética de unión de PA8-G3 a SpA. En estos experimentos, se inmovilizó el Ab PA8-G3 utilizando un sensor de captura antihumano y SpA natural comercializada. Estos datos muestran que PA8-G3 tiene una K_D de 5.38 pM. Esta afinidad es aproximadamente 1000 veces superior a la afinidad nanomolar de IgG1, IgG2 e IgG4 séricas humanas por SpA.

Se llevó a cabo un conjunto adicional de experimentos para determinar si el Ab PA8-G3 sería capaz de competir con éxito por la unión a SpA con IgG humana unida a SpA mediante su receptor Fc. En estos experimentos, se preincubaron dos cepas diferentes de *S. aureus* con sueros humanos (que contienen una concentración elevada de Ig las cuales se unen a SpA mediante sus regiones Fc) durante 15 minutos antes de la incubación con el Ab PA8-G3 biotinilado o el Ab MABp1-IgG3 biotinilado (control negativo con

isotipo emparejado), después se trataron con estreptavidina APC y a continuación, se determinó la fluorescencia mediante citometría de flujo. Los datos muestran que el Ab PA8-G3 fue capaz de unirse a SpA que tenía Ab de tipo IgG humanas
5 unidos a SpA mediante su dominio Fc (Figura 5).

En otro conjunto de experimentos, se demostró que el anticuerpo PA8-G3 compite con la unión de MABp1-IgG1 (el cual se une a SpA mediante su región Fc) a microesferas recubiertas con SpA. La preincubación de las microesferas de SpA con PA8-G3 redujo la unión de MABp1-IgG1 añadido más
10 tarde en un 80.3%. En cambio, con las microesferas de SpA preincubadas con MABp1-IgG1, el PA8-G3 añadido más tarde se unió a más de >30% de las superficies de las microesferas de SpA en un intervalo de 15 minutos, mientras que MABp1-IgG3
15 añadido más tarde (control negativo con isotipo emparejado que tiene el Fab de MABp1 y el Fc de IgG3 humana) no se unió significativamente a las microesferas de SpA preincubadas con MABp1-IgG1.

Se llevó a cabo un conjunto adicional de experimentos para estudiar la capacidad de Ab anti-SpA adicionales para promover la fagocitosis de SA por parte de células HL-60 diferenciadas. En estos experimentos, las células HL-60 diferenciadas se coincubaron con *S. aureus* marcada con verde pH-rodo y uno de los siguientes Ab: PA7.2-G3, PA4-G3, PA8-G3, PA15-G3, PA21-G3, PA27-G3, PA32-G3, PA37-G3 o
25 MABp1. Se utilizó MABp1 como control negativo en estos experimentos. Los datos muestran que todos los Ab anti-SpA estudiados fueron capaces de promover la opsonización y fagocitosis de *S. aureus* por parte de células HL-60 diferenciadas (Figura 6).
30

Se llevaron a cabo experimentos adicionales por Interferometría Bio-Layer (realizados utilizando un instrumento Octet Red 96 de ForteBio) para determinar la K_D

de siete Ab anti-SpA adicionales (se llevaron a cabo utilizando antígeno 20 nM). Los datos resultantes mostraron que PA7.2-G3 tiene una K_D inferior a 1×10^{-12} M, PA4-G3 tiene una K_D de 5.38×10^{-12} M, PA15-G3 tiene una K_D inferior a 1×10^{-12} M, PA21-G3 tiene una K_D inferior a 1×10^{-12} M, PA27-G3 tiene una K_D inferior a 1×10^{-12} M, PA32-G3 tiene una K_D inferior a 1×10^{-12} M y PA37-G3 tiene una K_D inferior a 1×10^{-12} M.

Resumiendo, los datos muestran que los Ab proporcionados en la presente se pueden unir con una afinidad muy elevada a SpA en la pared celular de SA, promueven la fagocitosis por parte de las células inmunitarias y son capaces de hacerlo en presencia de IgG humanas unidas a SpA mediante su dominio Fc.

Ejemplo 2. Estudio de supervivencia *en vivo* del anticuerpo monoclonal PA8 en un modelo de bactericemia/sepsis en ratones. Se examinó la supervivencia de ratones con bactericemia por *S. aureus* utilizando dosis profilácticas de PA8 (el anticuerpo monoclonal denominado PA8-G3 descrito en el Ejemplo 1).

Se adquirieron ratones hembra Balb/C (6-8 semanas de edad) del Charles River Laboratory, NIH, Maryland. Tras su llegada, se examinaron los ratones, se alojaron en grupos en jaulas (10/jaula) con un lecho absorbente. Todos los ratones estuvieron bajo las normas de cría requeridas que se pueden consultar en la Guía NIH para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

Se realizaron investigaciones sobre la eficacia protectora de PA8 en el modelo de sepsis por SA inducido mediante inyecciones intravenosas (i.v.) de 2×10^7 CFU de la cepa NR-46223 de MRSA. Los ratones se trataron por vía intravenosa con PA8 con dosis específicas (5 mg o 10 mg) 3 h antes de la infección con MRSA o dos dosis de 5 mg cada

una en el día 0 y 3. Los ratones de control se trataron únicamente con tampón de formulación. Se realizó un seguimiento de los ratones durante 10 días (dos veces al día) momento en el cual todos los ratones restantes se sacrificaron.

Tres horas después de la administración i.v. de PA8/tampón de formulación (0.1 mL), los ratones fueron expuestos a una inyección intravenosa (IV) única de la cepa NR-46223 de *S. aureus* (2×10^7 CFU en 0.1 mL). A un conjunto de ratones se les administraron dos dosis de 5 mg cada una en el día 0 y 3. Se detectaron diferencias significativas en los tiempos de supervivencia relativa entre los grupos de tratamiento. Haciendo referencia a las Fig. 7A-D, la administración pasiva de una dosis única de 5 mg (A) o 10 mg (B), o dos dosis de 5 mg en el día 0 y 3 (C), de mAb PA8 (por vía intravenosa) favorece la supervivencia de ratones BALB/c con sepsis por *Staphylococcus aureus* (inducida mediante una inyección intravenosa de 2×10^7 unidades formadoras de colonias de la cepa NR-46223 de *S. aureus* resistente a meticilina) de manera significativamente mayor que el tratamiento con tampón de formulación de una manera dependiente de la dosis (10 ratones por grupo). La sección (D) muestra la supervivencia utilizando todos los tratamientos diferentes en un gráfico. Sobrevivieron un cincuenta por ciento (5/10) de los ratones que recibieron 5 mg de Mab PA8 ($p=0.016$), un sesenta por ciento de los que recibieron dos dosis de 5 mg cada una ($p=0.09$) y un setenta por ciento (7/10) de los que recibieron 10 mg de mAb PA8 ($p=0.003$), en comparación con un 10% (1/10) de los ratones que recibieron el tampón de formulación (1/10) que sobrevivieron a la exposición bacteriana a NR-46223 de *S. aureus*. El análisis estadístico de los datos de los animales se realizó utilizando un

Análisis de la Supervivencia de Kaplan-Meier con una prueba de Mantel-Cox (logrank). Estos resultados indican claramente que PA8 proporciona un nivel significativo de protección frente a la infección letal con la cepa MRSA de *S. aureus*.

Ejemplo 3. Se inyectaron 0.5 mg de vancomicina por vía intraperitoneal, junto con diferentes dosis subóptimas de PA8-G3 (0 mg, 2.5 mg y 5 mg por vía intravenosa), a ratones hembra Balb/C (10 por grupo) de Charles River Laboratory dos horas antes de la infección con MRSA (NR 46223 con 3×10^7 de CFU i.v.). Se observó a los ratones durante 14 días. Haciendo referencia a las figuras 8A-C, en el día 14 únicamente habían sobrevivido un 10% de los ratones tratados con PBS y habían sobrevivido un 30% de los ratones tratados con vancomicina. Sin embargo, cuando se inyectaron 2.5 mg de PA8-G3 junto con el tratamiento de vancomicina, entonces sobrevivieron un 60% de los animales ($p=0.027$) y cuando se inyectaron 5 mg de PA8-G3 con vancomicina, entonces sobrevivieron un 60% de los animales y aquellos ratones que murieron vivieron más que con la dosis más baja ($p=0.016$). Estos datos indican que las dosis subeficaces de PA8-G3 pueden salvar animales con una bactericemia mediada por SA, cuando se tratan conjuntamente con dosis subóptimas de vancomicina. El análisis estadístico de los datos de los animales se realizó utilizando un Análisis de la Supervivencia de Kaplan-Meier con una prueba de Mantel-Cox (logrank).

OTRAS REALIZACIONES

Se debe sobreentender que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de esta, la descripción anterior se pretende que ilustre y no limite el alcance de la invención, que está definido por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas

y modificaciones están comprendidos en el alcance de las siguientes reivindicaciones.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la
5 práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.