

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 476**

51 Int. Cl.:

C07K 14/31 (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2011 PCT/US2011/035354**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11140337**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2011 E 11778343 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2566519**

54 Título: **Leucocidinas de Staphylococcus aureus, composiciones terapéuticas, y sus usos**

30 Prioridad:

05.05.2010 US 331550 P

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

14.03.2017

73 Titular/es:

**NEW YORK UNIVERSITY (100.0%)
70 Washington Square South
New York City, NY 10012, US**

72 Inventor/es:

**TORRES, VICTOR, J. y
DUMONT, ASHLEY, L.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 605 476 T3

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

DESCRIPCIÓN

Leucocidinas de *Staphylococcus aureus*, composiciones terapéuticas, y sus usos

Las bacterias *Staphylococcus aureus* o "staph" se encuentran normalmente en la piel o en la nariz de personas y animales. Las bacterias staph son generalmente inofensivas, a menos que entren en el cuerpo a través de un corte u otra lesión. Por lo general, las infecciones por staph son problemas menores de la piel en personas sanas. Históricamente, las infecciones por staph fueron tratadas con antibióticos de amplio espectro, como la metililina. Ahora, sin embargo, han surgido ciertas cepas de staph que son resistentes a la metililina y a otros antibióticos de beta-lactama tales como penicilina y cefalosporinas. Se les conoce como *Staphylococcus aureus* resistentes a la metililina (también conocidos como *Staphylococcus aureus* resistente a múltiples fármacos, o "MRSA").

Las infecciones por staph, incluyendo MRSA, generalmente comienzan como pequeñas protuberancias rojas que se asemejan a espinillas, hervir o picaduras de araña. Estas protuberancias o manchas pueden convertirse rápidamente en abscesos profundos y dolorosos que requieren drenaje quirúrgico. A veces las bacterias permanecen confinadas en la piel. En ocasiones, pueden penetrar profundamente en el cuerpo, causando infecciones potencialmente mortales en una amplia gama de tejidos humanos, incluyendo piel, tejidos blandos, huesos, articulaciones, heridas quirúrgicas, torrente sanguíneo, válvulas cardíacas, pulmones u otros órganos. Por lo tanto, las infecciones por *S. aureus* pueden provocar enfermedades potencialmente mortales tales como fascitis necrotizante, neumonía, endocarditis, sepsis, síndrome de choque tóxico y diversas formas de neumonía. La infección por MRSA es especialmente problemática en hospitales o en el hogar donde los pacientes son propensos a heridas abiertas, dispositivos invasivos y sistemas inmunológicos debilitados y, por lo tanto, corren mayor riesgo de infección que el público en general. Los trabajadores que no siguen procedimientos sanitarios adecuados pueden transferir bacterias MRSA de un paciente a otro.

S. aureus produce un conjunto diverso de factores de virulencia y toxinas que le permiten a esta bacteria neutralizar y soportar el ataque de diferentes tipos de células inmunes, específicamente subpoblaciones de glóbulos blancos que constituyen el sistema de defensa primario del cuerpo. La producción de estos factores de virulencia y toxinas le permiten a *S. aureus* mantener un estado infeccioso. Véase, Nizet, J. *Allergy Clin. Immunol.* 120: 13 - 22 (2007). Entre estos factores de virulencia, *S. aureus* produce varias leucotoxinas de dos componentes, que dañan las membranas de las células de defensa del huésped y los eritrocitos por la acción sinérgica de dos proteínas o subunidades no asociadas. Véase Supersac, y colaboradores, *Infect. Immun.* 61: 580 - 7 (1993). Entre estas leucotoxinas de dos componentes, la gamma-hemolisina (HlgAB y HlgCB) y la Leucocidina de Pantone-Valentine (PVL) son las más caracterizadas.

La toxicidad de las leucocidinas hacia las células de mamífero implica la acción de dos componentes. La primera subunidad se denomina subunidad de clase S (es decir, "eluida lentamente"), y la segunda subunidad se denomina subunidad de clase F (es decir, "eluida rápidamente"). Las subunidades S y F actúan sinérgicamente para formar poros en glóbulos blancos incluyendo monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (colectivamente conocidos como fagocitos). Véase, Menestrina, y colaboradores, *Toxicol.* 39: 1661 - 1672 (2001). El mecanismo por el cual las toxinas de dos componentes forman poros en las membranas de células objetivo no se entiende completamente. El mecanismo de acción propuesto de estas toxinas implica la unión de la subunidad S a la membrana celular objetivo, muy probablemente a través de un receptor, seguido por la unión de la subunidad F a la subunidad S, formando de este modo un oligómero que a su vez forma un poro previo que se inserta en la membrana celular objetivo (Jayasinghe, y colaboradores, *Protein. Sci.* 14: 2550-2561 (2005)). Los poros formados por las leucotoxinas de dos componentes son típicamente selectivos de cationes. La formación de poros causa la muerte celular a través de lisis, que en el caso de los glóbulos blancos objetivo se ha descrito como resultado de un desequilibrio osmótico debido a la afluencia de cationes (Miles, y colaboradores, *Biochemistry* 40: 8514-8522 (2001)).

Además de la PVL (conocida también como leucocidina S/F-PV o LukSF-PV) y gamma-hemolisina (HlgAB y HlgCB), se sabe que el repertorio de leucotoxinas de dos componentes producidas por *S. aureus* incluye leucocidina E/D (LukED) y leucocidina M/F' (LukMF'). Por lo tanto, las subunidades de clase S de estas leucocidinas de dos componentes incluyen HlgA, HlgC, LukE, LukS-PV y LukM, y las subunidades de clase F incluyen HlgB, LukD, LukF-PV y LukF'-PV (Menestrina, y colaboradores, citado más arriba). Las subunidades S y F de *S. aureus* no son específicas de la leucocidina. Es decir, son intercambiables de tal manera que otras combinaciones de dos componentes podrían formar un poro funcional en un glóbulo blanco, aumentando en gran medida el repertorio de leucotoxinas (Meyer, y colaboradores, *Infect. Immun* 77: 266-273 (2009)).

El diseño de una terapia eficaz para tratar la infección por MRSA ha sido especialmente desafiante. Además de la resistencia anteriormente mencionada a la metililina y antibióticos relacionados, se ha encontrado que MRSA tiene también niveles significativos de resistencia a macrólidos (por ejemplo, eritromicina), combinaciones de inhibidores de beta-lactamasa (por ejemplo, Unasyn, Augmentin) y fluoroquinolonas (por ejemplo ciprofloxacina), así como a clindamicina, trimetoprima/sulfametoxazol (Bactrim) y rifampina. En el caso de infección grave por *S. aureus*, los médicos han recurrido a la vancomicina por vía intravenosa. Sin embargo, ha habido informes de resistencia de *S. aureus* a la vancomicina.

Las proteínas de *S. aureus* que incluyen secuencias de aminoácidos y las correspondientes secuencias de nucleótidos se reportan en el documento WO 02/094868. Las secuencias específicas y su uso potencial como vacunas, en el desarrollo de antibióticos y/o como leucocidinas se reportan adicionalmente en bases de datos de secuencias con las entradas AAU37509, A6GIL8 y D1GPS9.

5 Se han descrito diversas variantes de Luk de las toxinas de dos componentes segregadas por *S. aureus* (Pedelacq y colaboradores, *Structure*, 7: 277-287 (1999)), por tener inhibidores séricos purificados de γ -hemolisina y leucocidina de plasma humano y su unión al componente LukS de leucocidina (Katsumi y colaboradores, *FEBS Letters* 460: 451-456 (1999)), y lisados de *S. aureus* para uso en el desarrollo de vacunas para *S. aureus* (O'Brien y colaboradores, *J. Dairy Sci.* 84: 1791 - 1799 (2001)).

10 Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos fármacos antibióticos que combatan eficazmente la infección por *S. aureus*.

Breve resumen de la invención

15 Los solicitantes han descubierto y caracterizado otro miembro de dos componentes del sistema de defensa nativo de *Staphylococcus aureus*. El componente polipeptídico de la subunidad S nativa recién caracterizado se denomina aquí "LukA", que abarca los polipéptidos nativos y sus análogos que tienen una similitud de secuencia de al menos el 70% con las secuencias de los polipéptidos nativos.

El componente polipeptídico de la subunidad F recientemente caracterizado se denomina aquí como "LukB", que abarca los polipéptidos nativos y sus análogos que tienen una similitud de secuencia de al menos 70% con las secuencias de los polipéptidos nativos.

20 Un aspecto de la presente solicitud se refiere a composiciones terapéuticas útiles para inhibir el inicio o el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus* que contiene cantidades terapéuticamente eficaces de LukA y LukB formuladas en un vehículo farmacéuticamente aceptable. De este modo, la composición terapéutica contiene cantidades terapéuticamente eficaces tanto de LukA como de LukB. En aún otras realizaciones, la composición contiene un análogo de LukA que carece de los 10 residuos C-terminales y que es no tóxico (denominado en este documento LukA Δ 10C o rLukA Δ 10C). Estas composiciones tienen múltiples usos terapéuticos. En algunas realizaciones, las composiciones se denominan composiciones antiinflamatorias y pueden usarse para tratar afecciones o trastornos inflamatorios agudos, particularmente afecciones inflamatorias agudas localizadas.

25 Estos usos explotan descubrimientos adicionales de los solicitantes que en condiciones fisiológicas (es decir, LukAB producido directamente por *S. aureus*), el complejo LukAB tiene una especificidad exquisita por los fagocitos, pero no para otras células nucleadas tales como células epiteliales y células endoteliales. Es decir, el complejo forma poros en las membranas de este tipo de células, causando así la muerte celular, a la que se denomina en la presente memoria como "citotoxicidad mediada por LukAB". Por otra parte, LukAB tiene una especificidad relativamente pequeña o insignificante con respecto a otras células de mamífero nucleadas. De este modo, las composiciones antiinflamatorias de la presente invención explotan la especificidad de LukAB por fagocitos humanos, con el fin de tratar afecciones inflamatorias agudas, que se caracterizan por la infiltración masiva de fagocitos al sitio de inflamación.

30 En otras realizaciones, las composiciones terapéuticas pueden denominarse como una composición de vacuna (activa). Las composiciones pueden usarse para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes anti-LukA y anti-LukB en un sujeto en riesgo de infección por *S. aureus* o un sujeto diagnosticado con infección por *S. aureus* tal como MRSA.

35 Se describen anticuerpos que se unen específicamente a LukA, anticuerpos que se unen específicamente a LukB, composiciones terapéuticas que contienen los anticuerpos LukA y/o LukB y sus usos para tratar estados infecciosos causados por *S. aureus*. Estas composiciones terapéuticas pueden denominarse composiciones de vacunas pasivas. Por lo tanto, una composición terapéutica puede contener una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos anti-LukA. La composición terapéutica puede contener una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpos anti-LukB. La composición terapéutica puede contener cantidades terapéuticamente eficaces tanto de anticuerpos anti-LukA como anti-LukB.

40 Las composiciones de vacuna pasivas y activas explotan el descubrimiento adicional de los solicitantes de que cepas infecciosas, virulentas de *S. aureus* tales como MRSA, expresan LukA y LukB. La conservación de LukA y LukB a través de un amplio espectro de cepas de *S. aureus* permite a las vacunas de la presente invención proporcionar eficacia terapéutica de espectro completo. LukA, LukB, anticuerpos anti-LukA y anticuerpos anti-LukB también se denominan en la presente memoria como agentes activos.

45 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a métodos de utilización de LukA y LukB para identificar inhibidores potenciales de citotoxicidad mediada por LukAB. Estos métodos pueden utilizar el complejo LukAB, por sí

mismo, en combinación con un fagocito, o una porción del mismo que se une a la membrana del fagocito. Los inhibidores así identificados pueden ser candidatos para terapia con el propósito de tratar una infección por *S. aureus*.

Incluso un aspecto adicional de la presente invención está dirigido a un método para predecir o evaluar la gravedad de una infección por *S. aureus* que implica detectar la presencia o cantidad de LukA y LukB, o detectar los genes correspondientes de LukA y LukB, en una muestra biológica obtenida de un sujeto infectado. Este aspecto de la presente invención se basa en el descubrimiento adicional de los solicitantes de que entre las muchas citotoxinas producidas por *S. aureus*, LukAB exhibe una toxicidad potente hacia fagocitos humanos. Por lo tanto, la detección de presencia o de cantidades relativamente elevadas de LukA y/o LukB, o sus genes correspondientes (por ejemplo, como la exhibida por la cepa Newman de *S. aureus*, 4645 y cepas de MRSA, USA300 y USA500) con respecto a un control (por ejemplo, cepas USA100 y USA400 de *S. aureus*) que produce cantidades pequeñas o indetectables de LukA y/o LukB, es indicativa de una infección severa por *S. aureus*.

Estos y otros aspectos de la presente invención se describen más completamente a continuación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una alineación que contiene la secuencia de aminoácidos de una secuencia mayoritaria de LukA (designada como SEQ ID NO: 1) y los polipéptidos LukA de trece (13) cepas diferentes de *S. aureus* a las que corresponde (designadas como SEQ ID NOS: 2 - 14).

La Figura 2 es una alineación que contiene la secuencia de aminoácidos de una secuencia mayoritaria de LukB (denominada SEQ ID NO: 15), y los polipéptidos LukB de doce (12) cepas diferentes de *S. aureus* a las que corresponde (designadas como SEQ ID NOS: 16 - 27).

Figura 3. LukAB es una potente citotoxina estafilocócica que ataca y mata fagocitos humanos primarios.

(a) Intoxicación de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) primarias con un filtrado de cultivo (2,5% v/v) de la cepa Newman de *S. aureus* (TS) y las cepas mutantes isogénicas indicadas. La viabilidad celular se controló usando CellTiter, donde las células tratadas con medio se tomaron como el 100%. Los resultados representan el promedio de muestras por triplicado + desviación estándar (DE).

(b) Intoxicación de monocitos humanos primarios, macrófagos y células dendríticas (CD) con un filtrado de cultivo (2,5% v/v) de la cepa Newman de *S. aureus* (TS) y las cepas mutantes isogénicas indicadas. La viabilidad celular se controló como se describió anteriormente. Los resultados representan la media de dos donantes, donde las células de cada donante fueron intoxicadas con tres preparaciones independientes de exoproteína, + S.E.M.

(c) Intoxicación de PMN primarios humanos con diversas diluciones de filtrados de cultivo de la cepa Newman de *S. aureus* (TS) y las cepas mutantes isogénicas indicadas. La viabilidad celular se controló como se describió anteriormente. Los resultados representan la media de los PMN aislados de cuatro donantes \pm S.E.M.

(d) Intoxicación de PMN primarios humanos con rLukA, rLukB purificados, o una combinación de rLukA y rLukB a las concentraciones indicadas. * Indica significancia estadística tanto de rLukA como de rLukB, $P < 0,05$. Para los paneles (a-c) * indica significancia estadística de TS, ** indica significancia estadística de Δ LukAB/p, $P < 0,05$ (prueba t de Student $p < 0,05$).

Figura 4. LukAB se dirige preferentemente a las células fagocíticas humanas. Intoxicación de células PMN-HL60 (a, c y d) o THP1 con diversas diluciones de filtrado de cultivo de la cepa Newman de *S. aureus* de TS, cepas mutantes isogénicas que carecen de los genes/toxinas indicados, (c) filtrado de cultivo de *S. aureus* TS que contiene un plásmido vacío (TS/p), una cepa que carece de LukAB con un plásmido vacío (Δ LukAB/p) y una cepa que carece de LukAB con un plásmido de complementación LukAB (Δ LukAB/pLukAB), o (d) con LukA (rLukA), LukB (rLukB) recombinante purificado, o una combinación de rLukA y rLukB (rLukA+rLukB) a las concentraciones indicadas. Para las intoxicaciones tanto con rLukA como con rLukB, la concentración total de proteína se compone de cantidades iguales de rLukA y rLukB (por ejemplo, 2,8 μ g de proteína total es igual a 1,4 μ g de rLukA y 1,4 μ g de rLukB). (e) Intoxicación de las líneas celulares humanas indicadas con 10 μ g/ml de rLukAB. La viabilidad celular se controló usando CellTiter, donde las células tratadas con medio se tomaron como el 100%. Los resultados representan el promedio de muestras por triplicado \pm DE. El asterisco (*) denota diferencia estadísticamente significativa en comparación con TS (ANOVA de un solo factor).

Figura 5. LukAB es una toxina importante en diferentes cepas estafilocócicas. (A) Expresión de LukB por varias cepas de *S. aureus* según se determinó mediante análisis de transferencia tipo Western usando sueros policlonales anti-LukB. (B) Intoxicación de PMN-HL60 con diluciones de exoproteínas de diferentes cepas de *S. aureus*. La viabilidad celular se controló usando CellTiter, donde las células tratadas con medio se tomaron como 100% viables. (C) Expresión de LukB y toxina α por cepas isogénicas TS y LukAB según se determinó por análisis de transferencia tipo Western usando

sueros específicos de la toxina. (D) Intoxicación de PMN-HL60 con exoproteínas de cepas TS Newman (New.) y 4645, y las cepas isogénicas LukAB. La viabilidad celular se controló como en el Panel B. Los resultados representan el promedio de muestras por triplicado + DE. * Denota diferencia estadísticamente significativa en comparación con Newman (C) o con TS (E) (prueba t de Student $p < 0,05$).

5 Figura 6. LukAB rompe las membranas plasmáticas de las células objetivo. (a) Imágenes de microscopía óptica de células PMN-HL60 intoxicadas con filtrado de cultivo de la cepa de *S. aureus* TS y la cepa isogénica carente de LukAB (Δ LukAB). (b-c) Intoxicación de células PMN-HL60 con filtrados de cultivo de la cepa TS (TS/p), la cepa isogénica carente de LukAB (Δ LukAB/p), la cepa complementada (Δ LukAB/pLukAB) o intoxicada en forma simulada con medio. Las células con membranas comprometidas se tiñeron con SYTOX Green, se obtuvieron imágenes mediante microscopía de fluorescencia (c), y se midió la intensidad de fluorescencia verde (b). (d) Los PMN se infectaron ex vivo con la cepa Newman de *S. aureus* (MSSA) o la cepa LAC USA300 (MRSA) y los mutantes isogénicos indicados con diversas multiplicidades de infección (MOI). El daño a la membrana se controló con verde SYTOX. Los resultados representan el promedio de muestras por triplicado \pm DE. Los asteriscos (*) indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con TS (prueba t de Student $p < 0,05$).

15 Figura 7. LukAB protege a *S. aureus* de la muerte mediada por el huésped atacando y matando fagocitos. (a) Infección de células PMN-HL60 con *S. aureus* TS, una cepa que carece de lukAB, y la cepa que carece de lukAB con un plásmido de complementación lukAB (Δ lukAB/plukAB) en diversas multiplicidades de infección (MOI). Las células de mamífero con membranas comprometidas se controlaron con SYTOX Green como se describe en la Figura 6. Los resultados representan el promedio de muestras por triplicado + DE. (b) Viabilidad de las cepas de *S. aureus* indicadas tras la infección ex vivo de sangre entera humana. Los resultados representan la media de la sangre entera aislada de 12 donantes + S.E.M. (c) Viabilidad de las cepas Newman de *S. aureus* indicadas tras la infección de neutrófilos humanos primarios (PMN). Los resultados representan la media de los PMN aislados de 12 donantes + S.E.M. (d) Intoxicación de PMN humanos primarios con diversas diluciones de filtrado de cultivo a partir de las cepas TS/p, OlukAB/p, y Δ lukAB/plukAB. La liberación de LDH se midió como un indicador de lisis celular. Los resultados representan la media de PMN aislados de 6 donantes + S.E.M. Los asteriscos (*) indican diferencia estadísticamente significativa en comparación con la cepa TS de Newman (prueba t de Student $p < 0,05$).

20 Figura 8. LukAB es importante para la patogénesis de *S. aureus* in vivo. (a) Imágenes bioluminiscentes de riñones de ratones infectados con la cepa LAC de *S. aureus* TS que contiene pXen1 o pLukAB.Xen1. Se muestran los riñones de dos ratones representativos por grupo. (b) Carga bacteriana recuperada de los riñones de ratones infectados retroorbitalmente con las cepas LAC de *S. aureus*. Cada punto de datos representa el número de bacterias (CFU) por mililitro de homogeneizado de tejidos en un solo animal. La línea discontinua indica el límite de detección. Para los paneles (A-C y E) * indica significancia estadística de TS, ** indica significancia estadística de Δ LukAB/p, $P < 0,05$.

25 Figura 9. LukAB mata a los fagocitos humanos que forman poros en las membranas celulares. (a) las células PMN-HL60 fueron intoxicadas con rLukA+rLukB y la unión a la toxina se controló mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia usando anticuerpos específicos para LukA o LukB. (b) Se incubaron PMN-HL60 con rLukAB y se determinó la unión de la toxina por FACS usando un anticuerpo anti-His de conejo. (c) Las células PMN-HL60 fueron intoxicadas con rLukAB y la formación de oligómeros LukAB en la membrana plasmática se determinó por SDS-PAGE e inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-LukB. (d) PMN-HL60 intoxicadas con rLukAB o tratadas con saponina en presencia o ausencia de PEG-400. Los poros LukAB se detectaron con bromuro de etidio. (e) Viabilidad de PMN-HL60 tratadas como en panel determinado con CellTiter, donde las células tratadas con medio se tomaron como 100%. Los resultados en los paneles d y e representan el promedio de las muestras por triplicado \pm SEM. * Denota diferencia estadísticamente significativa para -PEG (panel d-e) (prueba t de Student $p < 0,05$).

30 Figura 10. La citotoxicidad de LukAB puede neutralizarse mediante un anticuerpo policlonal α -LukA. La intoxicación de las PMN-HL60 con un filtrado de cultivo al 5% (v/v) de la cepa Newman de *S. aureus* que se había incubado con las cantidades indicadas de anticuerpos policlonales α -LukA o suero previamente inmune de diversos sangrados de producción de dos conejos diferentes. La viabilidad celular se controló usando CellTiter, donde las células tratadas con medio se tomaron como el 100%. Los resultados representan el promedio de muestras por triplicado \pm desviación estándar (DE).

35 Figura 11. La extensión del C-terminal de LukA es necesaria para el efecto citotóxico de LukAB pero no es necesaria para el reconocimiento por un anticuerpo policlonal α -LukA. (a) Alineación de secuencias de aminoácidos de las diversas subunidades S de leucotoxina de *S. aureus* (designadas como SEQ ID NOS: 44-49) llevada a cabo usando el método MegAlign Clustal W a partir del software Lasergene. Las extensiones del N-terminal y del C-terminal sólo presentes en la secuencia de LukA se enfatizan con cajones. (b) Tinción con azul de Coomassie de 2 μ g de LukA recombinante (rLukA), LukB (rLukB), careciendo LukA de la extensión C-terminal (rLukA Δ 10C) y LukA que carece de la extensión N-terminal (r Δ 33NLukA) purificada a partir de *E. coli* y separada por SDS-PAGE acompañada por intoxicación de las PMN-HL60 con diversas cantidades de rLukA, rLukA Δ 10C y r Δ 33NLukA apareadas con rLukB. La concentración final de proteína representa cantidades iguales de rLukA, rLukA Δ 10C o r Δ 33NLukA y rLukB. Los resultados representan el promedio de muestras por triplicado \pm DE. (c) Inmunotransferencia que muestra un reconocimiento equivalente de rLukA Δ 10C marcado con 6 x His por ambos anticuerpos policlonales α -LukA y α -His.

Descripción detallada

La siguiente divulgación está dirigida, en orden sucesivo, a polipéptidos LukA, polipéptidos LukB, polinucleótidos LukA y LukB, anticuerpos anti-LukA y anti-LukB, composiciones terapéuticas que contienen LukA y/o LukB, o anticuerpos anti-LukA y/o anti-LukB, métodos para usar las composiciones terapéuticas, métodos para identificar inhibidores de la citotoxicidad mediada por LukAB y métodos para predecir o evaluar la gravedad de una infección por *S. aureus*.

Polipéptidos LukA

Los polipéptidos nativos de *Staphylococcus aureus* han sido ahora aislados e identificados por los solicitantes porque presentan el perfil de actividad de las leucocidinas conocidas de la subunidad S (por ejemplo, LukS-PVL, LukE y HlgC). Estos polipéptidos que se designan colectivamente en este documento como LukA, se dirigen y unen específicamente a fagocitos humanos (pero no a las células epiteliales humanas o células endoteliales humanas o células murinas), y una vez unidos a la membrana del fagocito, LukA se oligomeriza con una leucocidina de la subunidad F de *S. aureus* (por ejemplo, LukF-PVL, LukD y HlgB, y LukB como se describe en la presente memoria), y después de la oligomerización forma un poro transmembrana (denominado colectivamente como actividad de LukA). La alineación ilustrada en la Fig. 1 contiene las secuencias de aminoácidos de una secuencia mayoría de LukA (designada en el presente documento como SEQ ID NO: 1) y los polipéptidos LukA de 13 cepas diferentes de *S. aureus* a las que corresponde (designadas en la presente memoria como SEQ ID NOS: 2-14).

Los residuos de 27 aminoácidos N-terminales en cada una de las SEQ ID NOS: 1-14 representan la secuencia nativa de secreción/señal. Por lo tanto, la forma segregada madura de LukA, que está representada por los residuos de aminoácidos 28-351 en cada una de las SEQ ID NOS: 1-14, se puede denominar en la presente memoria "LukA (28-351)" o "LukA madura". Correspondientemente, la forma inmadura de LukA se puede denominar en la presente memoria como "LukA (1-351)".

Una secuencia de consenso de LukA, con base en las SEQ ID NOS: 2-14 (que no son exhaustivas con respecto a LukA nativo de *S. aureus*) incluiría por lo tanto variabilidad en un mínimo de 64 posiciones de LukA (en donde las posiciones consecutivas de variabilidad se denotan como X¹-X⁶⁴), designado como sigue: 8 (X¹ = L o F), 16 (X² = A o V), 17 (X³ = I o L), 24 (X⁴ = T o N), 26 (X⁵ = Q o E), 31 (X⁶ = H o N), 38 (X⁷ = N o T), 46 (X⁸ = S o A), 50 (X⁹ = E o D), 55 (X¹⁰ = T o N), 56 (X¹¹ = N o D), 61 (X¹² = S o T), 62 (X¹³ = T o P), 63 (X¹⁴ = A, G o V), 73 (X¹⁵ = I o V), 78 (X¹⁶ = E o V), 77 (X¹⁷ = T o S), 80 (X¹⁸ = V o E), 83 (X¹⁹ = E o K), 84 (X²⁰ = E o K), 105 (X²¹ = V o I), 124 (X²² = K o R), 125 (X²³ = E o N), 127 (X²⁴ = K, T o N), 129 (X²⁵ = S o A), 130 (X²⁶ = N o S), 135 (X²⁷ = K o Q), 146 (X²⁸ = R o S), 148 (X²⁹ = R o P), 173 (X³⁰ = S o N), 174 (X³¹ = S o L), 181 (X³² = T o V), 184 (X³³ = I o V), 195 (X³⁴ = T o S), 202 (X³⁵ = N o K), 208 (X³⁶ = S o I), 214 (X³⁷ = W o R), 221 (X³⁸ = I o V), 229 (X³⁹ = G o N), 231 (X⁴⁰ = V o I), 237 (X⁴¹ = E o D), 239 (X⁴² = L o F), 243 (X⁴³ = N o T), 246 (X⁴⁴ = I o L), 247 (X⁴⁵ = A o S), 278 (X⁴⁶ = L o I), 283 (X⁴⁷ = S o T), 285 (X⁴⁸ = E o D), 288 (X⁴⁹ = Q o R), 299 (X⁵⁰ = I o V), 303 (X⁵¹ = R o K), 309 (X⁵² = A o G), 310 (X⁵³ = P o Q), 315 (X⁵⁴ = K o Q), 318 (X⁵⁵ = D o E), 322 (X⁵⁶ = L o F), 325 (X⁵⁷ = T o V), 338 (X⁵⁸ = V o I), 339 (X⁵⁹ = D o E), 342 (X⁶⁰ = S o T), 344 (X⁶¹ = D, E o Q), 347 (X⁶² = P o S), 348 (X⁶³ = Y o F), y 349 (X⁶⁴ = K o R).

Polipéptidos LukB.

Los solicitantes han identificado ahora los polipéptidos nativos de *Staphylococcus aureus* que exhiben el perfil de actividad de las leucocidinas conocidas de la subunidad F (por ejemplo, LukF-PVL, LukD y HlgB). Estos polipéptidos que se designan colectivamente en este documento como LukB, se oligomerizan específicamente con una leucocidina de la subunidad S de *S. aureus* (por ejemplo, LukS-PVL, LukE y HlgC, y LukA como se describe en el presente documento) que está unida a un fagocito humano; y después de la oligomerización forman un poro transmembrana en el fagocito (denominado colectivamente actividad de LukB). La alineación ilustrada en la Fig. 2 contiene las secuencias de aminoácidos de la mayoría de las secuencias de LukB (designadas en la presente memoria como SEQ ID NO: 15) y los polipéptidos LukB de las 12 cepas diferentes de *S. aureus* a las que corresponden (designadas aquí como SEQ ID NO: 16-27).

Los 29 residuos de aminoácidos N-terminales en cada una de las SEQ ID NOS: 15-27 representan la secuencia de secreción/señal. Por lo tanto, la forma segregada madura de LukB, que está representada por los residuos de aminoácidos 30-339 en cada una de las SEQ ID NO: 16-27, se puede denominar en la presente memoria "LukB (30-339)" o "LukB madura". Correspondientemente, la forma inmadura de LukB puede denominarse en la presente memoria como "LukA (1-339)".

Una secuencia consenso de LukB, con base en las SEQ ID NOS: 15-28 (que no son exhaustivas con respecto a LukB nativo de *S. aureus*) incluiría por lo tanto variabilidad en un mínimo de 49 posiciones de LukB (en donde las posiciones consecutivas de variabilidad se denotan X¹ - X⁴⁹), designado como sigue: 5 (X¹ = L o V), 6 (X² = C o Y), 13 (X³ = S o T), 15 (X⁴ = A o T), 16 (X⁵ = L o I), 19 (X⁶ = A o T), 20 (X⁷ = L o F), 23 (X⁸ = F o L), 26 (X⁹ = S o T), 28 (X¹⁰ = Y o F), 34 (X¹¹ = E o K), 36 (X¹² = K o T), 37 (X¹³ = Q, T o A), 46 (X¹⁴ = D o E), 59 (X¹⁵ = S o T), 60 (X¹⁶ = Q o E), 62 (X¹⁷ = N o K), 64 (X¹⁸ = T o S), 75 (X¹⁹ = P o K), 95 (X²⁰ = K o R), 98 (X²¹ = N, d o E), 126 (X²² = S o una supresión), 159 (X²³ = R o Q),

163 (X²⁴ = T o P), 170 (X²⁵ = S o K), 187 (X²⁶ = L o I), 190 (X²⁷ = S o P), 192 (X²⁸ = S o T), 193 (X²⁹ = S o T), 193 (X²⁹ = H o N), 197 (X³⁰ = G o A), 204 (X³¹ = S o L), 222 (X³² = D o N), 224 (X³³ = T o V), 247 (X³⁴ = N o D), 270 (X³⁵ = N o K), 272 (X³⁶ = K o E), 276 (X³⁷ = R, Q o K), 287 (X³⁸ = D o E), 290 (X³⁹ = L o I), 294 (X⁴⁰ = K o R), 309 (X⁴¹ = Q o K), 327 (X⁴² = D o N), 329 (X⁴³ = L o F), 330 (X⁴⁴ = I o V), 332 (X⁴⁵ = t o V), 333 (X⁴⁶ = f, l o L), 336 (X⁴⁷ = K o N), y 338 (X⁴⁸ = K o Q).

Las leucocidinas LukA y LukB pueden diferir de los polipéptidos nativos designados como SEQ ID NOS: 2-14 y 16-27 respectivamente, en términos de una o más inserciones, sustituciones o supresiones de aminoácidos adicionales, por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos en las SEQ ID NOS: 2-14 o 16-27 pueden estar sustituidos por otro aminoácido de polaridad similar, que actúa como un equivalente funcional, dando como resultado una alteración silenciosa. Es decir, el cambio relativo a la secuencia nativa no disminuiría apreciablemente las propiedades básicas de LukA y LukB nativos. Los ejemplos incluyen las SEQ ID NOS: 1 y 15. Cualquiera de dichos análogos de LukA o LukB puede ser rastreado de acuerdo con los protocolos descritos en la presente memoria (por ejemplo, el ensayo de toxicidad celular y el ensayo de daño de la membrana) para determinar si mantiene la actividad LukA o LukB nativo. Las sustituciones dentro de estas leucocidinas pueden seleccionarse entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

En otras realizaciones, se pueden realizar alteraciones no conservadoras (por ejemplo, una o sustituciones, supresiones y/o adiciones de aminoácidos) con el fin de inactivar o desintoxicar LukA y LukB. En una realización, el análogo no tóxico de LukA difiere de los polipéptidos nativos en que se eliminan los aminoácidos C-terminales en las posiciones 342-351. Con la excepción de las SEQ ID NO: 4-6 (que contienen 9 aminoácidos en estas posiciones), el análogo carece de los 10 residuos de aminoácidos C-terminales. Colectivamente, estos análogos se denominan LukAΔ10C. Los LukA y LukB desintoxicados se pueden usar en las composiciones de vacunas activas descritas en la presente memoria. Las alteraciones moleculares pueden realizarse por métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo la extensión del cebador en una plantilla de plásmido usando plantillas de cadena sencilla (Kunkel, Proc. Acad. Sci., USA 82: 488-492 (1985)), plantillas de ADN de cadena doble (Papworth y colaboradores, Strategies 9 (3): 3-4 (1996)), y mediante clonación por PCR (Braman, J. (ed.), IN VITRO MUTAGENESIS PROTOCOLS, 2ª ed. Humana Press, Totowa, NJ (2002)). Los métodos para determinar si una alteración molecular dada en LukA o LukB reduce la citotoxicidad de LukAB se describen en la presente memoria.

Por lo tanto, en vista de lo anterior y para los propósitos de la presente invención, LukA se puede describir más ampliamente en términos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-14 (por ejemplo, la SEQ ID NO: 2, que es el polipéptido LukA nativo de la cepa Newman de *S. aureus*), o un polipéptido (nativo o no nativo) que tiene al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 % o 99% de similitud de secuencia con la misma.

Del mismo modo, en vista de lo anterior y para los propósitos de la presente invención, LukB puede describirse más ampliamente en términos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 15-27 (por ejemplo, la SEQ ID NO: 27, que es el polipéptido LukB nativo de la cepa Newman de *S. aureus*), o un polipéptido (nativo o no nativo) que tiene al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 % o 99% de similitud de secuencia con la misma.

Por lo tanto, a menos que se indique lo contrario, tanto las formas inmaduras como las maduras de LukA y LukB nativos, y las secuencias que tienen menos del 100% de similitud con LukA nativo (es decir, secuencias nativas y análogos por igual, denominados colectivamente aquí "LukA" y "LukB") se pueden usar en las composiciones y métodos, y para elaborar los anticuerpos anti-LukA y anti-LukB de la presente invención.

Polinucleótidos que codifican LukA y LukA y métodos de síntesis o aislamiento de LukA y LukB

Las leucocidinas LukA y LukB pueden sintetizarse a través de metodologías de ADN recombinante que son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se expone a continuación una secuencia de nucleótidos (denominada SEQ ID NO: 28) que codifica el polipéptido LukA de *S. aureus* (Newman) (SEQ ID NO: 2). Las secuencias degeneradas (por ejemplo, que pueden ser útiles en vista de las preferencias de codón en huéspedes de elección para fines de expresión recombinante) que codifican este polipéptido y los polinucleótidos que codifican otros polipéptidos LukA son conocidos en la técnica o pueden ser diseñados por personas expertas en la técnica.

ES 2 605 476 T3

atgaaaaataaaaaacgtgttttaatagcgtcatcattatcatgtgcaattttatttgta
M K N K K R V L I A S S L S C A I L L L
tcagcagcaacgactcaagcaaattcagctcataaagactctcaagaccaaataagaaa
S A A T T Q A N S A H K D S Q D Q N K K
gaacatggtgataagtctcaacaaaaagacaaaacgtaatggttactaataaagataaaaat
E H V D K S Q Q K D K R N V T N K D K N
tcaacagcaccggatgatattgggaaaaacggtaaaatcacaaaacgaactgaaacagta
S T A P D D I G K N G K I T K R T E T V
tatgatgagaaaacaaatataactccaaaatttacaattcgactttatcgatgatccaact
Y D E K T N I L Q N L Q F D F I D D P T
tatgacaagaatgtattacttgttaaaaaacaaggctcaattcattcaaatttaaagttt
Y D K N V L L V K K Q G S I H S N L K F
gaatctcataaagaagaaaaaaattcaaattgggttaaagtatccaagtgagtaccatgta
E S H K E E K N S N W L K Y P S E Y H V
gattttcaagtaaaaagaaatcgtaaaactgaaatattagaccaattgccgaaaaataaa
D F Q V K R N R K T E I L D Q L P K N K
atttcaactgcaaaagtagacagtacattttcatatagctcaggtggtaaattcgattca
I S T A K V D S T F S Y S S G G K F D S
acaaaaggtattggacgaacttcatcaaatactactccaaaacgattagttataatcag
T K G I G R T S S N S Y S K T I S Y N Q
caaaattatgacacaattgccagcggtaaaaaataaactggcatgtacactggtcagtt
Q N Y D T I A S G K N N N W H V H W S V
attgcgaatgacttgaagtatgggtggagaagtgaaaaatagaaatgatgaattattatc
I A N D L K Y G G E V K N R N D E L L F
tatagaaatacagagaattgctactgtagaaaaccctgaactaagctttgcttcaaaatat
Y R N T R I A T V E N P E L S F A S K Y
agataccagcattagtaagaagtggctttaatccagaatttttaacttatttatcta
R Y P A L V R S G F N P E F L T Y L S N
gaaaagtcaaatgagaaaacgcaatttgaagtaacatacacacgaaatcaagatattttg
E K S N E K T Q F E V T Y T R N Q D I L
aaaaacagacctggaatacattatgcacctccaattttagaaaaaaataaagatgggtcaa
K N R P G I H Y A P P I L E K N K D G Q
agattaattgtcacttatgaagttgattggaaaaataaaaacagttaaagtcgttgataaa
R L I V T Y E V D W K N K T V K V V D K
tattctgatgacaataaaccttataaagaaggataa
Y S D D N K P Y K E G

ES 2 605 476 T3

A continuación se expone una secuencia de nucleótidos (designada aquí como SEQ ID NO: 29) que codifica el polipéptido LukB de *S. aureus* (Newman), (SEQ ID NO: 27). Las secuencias degeneradas (por ejemplo, que pueden ser útiles en vista de las preferencias de codón en huéspedes de elección para fines de expresión recombinante) que codifican este polipéptido, y los polinucleótidos que codifican otros polipéptidos LukB son conocidos en la técnica o pueden ser diseñados por personas expertas en la técnica.

5

```
atgattaaacaactatgtaaaaaatcaccaatttgtacgtagcactatcgactactttc
M I K Q L C K N I T I C T L A L S T T F
actgtattaccagctacttcatttgcaaagattaattctgaaatcaaacaagtttctgag
T V L P A T S F A K I N S E I K Q V S E
aagaatcttgatggtgatactaaaatgtatacacgtacagctacaacaagtgatagtcaa
K N L D G D T K M Y T R T A T T S D S Q
aaaaatattactcaaagcttacaatttaatttcttaactgaacctaattatgataaagaa
K N I T Q S L Q F N F L T E P N Y D K E
acagtatttattaaagcaaaaggtacaattggtagtggtttgagaattttagacccaaat
T V F I K A K G T I G S G L R I L D P N
ggttattggaatagtacattaagatggcctggatcttattcagtttcaattcaaaatggt
G Y W N S T L R W P G S Y S V S I Q N V
gatgacaacaacaatacaaatgtgactgactttgcaccaaaaaaatcaggatgaatcaaga
D D N N N T N V T D F A P K N Q D E S R
gaagttaaatacgtatggttataaaacaggtggagatttttcgattaatcgtggaggc
E V K Y T Y G Y K T G G D F S I N R G G
ttaactggaaatattacaaaagagagtaattattcagagacgattagttatcaacaacca
L T G N I T K E S N Y S E T I S Y Q Q P
tcatatcgtagacttctgatcaatctacgtcacataaaggtgtagggtggaaagtagaa
S Y R T L L D Q S T S H K G V G W K V E
gcacatttgataaataatgaggacatgaccatacagagacaattaactaatgatagtgat
A H L I N N M G H D H T R Q L T N D S D
aatagaactaaaagtgaaattttttcttaacacgaaatggaaatttatgggcgaaagat
N R T K S E I F S L T R N G N L W A K D
aatttcacacctaagacaaaatgcctgtaactgtgtctgaagggtttaatccagaattt
N F T P K D K M P V T V S E G F N P E F
ttagctggttatgtcacatgataaaaaagacaaaaggtaaatcaccaatttggtggttcattat
L A V M S H D K K D K G K S Q F V V H Y
aaaagatcaatggatgagtttaaaatagattggaatcgccatgggtttctggggctattgg
K R S M D E F K I D W N R H G F W G Y W
tctggtgaaaaccatgtagataaaaaagaagaaaaattatcagcattatgaagttgat
S G E N H V D K K E E K L S A L Y E V D
tgggaagacacataatgtgaagtttgtaaaagtacttaatgataatgaaaagaaataa
W K T H N V K F V K V L N D N E K K -
```

Los polinucleótidos que codifican LukA y LukB pueden expresarse en un huésped tal como bacterias (*E. coli*), plantas y/o levadura y luego aislarse y purificarse. Alternativamente, las leucocidinas LukA y LukB pueden aislarse de bacterias *S. aureus* (por ejemplo, la cepa Newman) de acuerdo con técnicas estándar. Por lo tanto, estas leucocidinas pueden aislarse (de un entorno nativo o no nativo). También pueden purificarse porque están sustancialmente libres de otras proteínas y componentes celulares con los que LukA y LukB de *S. aureus* están asociados en su estado nativo (es decir, proteínas y componentes celulares presentes en células de *S. aureus*) o un estado no nativo (es decir, proteínas y componentes celulares de un huésped celular recombinante). Esquemas de purificación adecuados, que típicamente implican una combinación de al menos dos procedimientos sucesivos, son conocidos en la técnica. Véase, Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Springer-Verlag, N.Y. (1982), utilizando una o una combinación de dos o más técnicas estándar tales como cromatografía en columna de afinidad y cromatografía líquida de intercambio catiónico.

Anticuerpo anti-LukA y anticuerpos anti-LukB

Se divulgan los anticuerpos anti-Luka que se unen específicamente a Luka, y los anticuerpos anti-LukB que se unen específicamente a LukB, las composiciones terapéuticas que contienen los anticuerpos, y los métodos de uso de los mismos. El término anticuerpo incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos y formas genéticamente modificadas de los anticuerpos, y combinaciones de los mismos. Más específicamente, el término "anticuerpo", que se utiliza de forma intercambiable con el término "inmunoglobulina", incluye moléculas de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, de origen natural o formadas por los procesos de recombinación de fragmentos de genes de inmunoglobulina normal) (por ejemplo, un anticuerpo IgG) y fragmentos inmunológicamente activos de los mismos (es decir, incluyendo la porción de unión específica de la molécula de inmunoglobulina de longitud completa), que de nuevo puede ser de naturaleza natural o de naturaleza sintética. Por consiguiente, el término "fragmento de anticuerpo" incluye una porción de un anticuerpo tal como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo de longitud completa, y, en el contexto de la presente invención, se une específicamente a Luka, LukB o un complejo LukAB. Los métodos de elaboración y cribado de fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos anti-Luka pueden tener cierto grado de reactividad cruzada con otras subunidades S de leucocidina de *Staphylococcus* tales como HlgC, LukS-PVL, HlgA, LukS-I, LukE, LukEv y LukM. Del mismo modo, los anticuerpos anti-LukB pueden tener cierto grado de reactividad cruzada con otras subunidades F de leucocidina de *Staphylococcus* tales como LukF-PV, LukF-PV, LukDv, LukD, LukF-I y HlgB. Los anticuerpos anti-Luka y/o anti-LukB pueden inhibir o reducir la actividad de Luka y la actividad de LukB, respectivamente. Los anticuerpos anti-Luka y/o anti-LukB pueden neutralizar (por ejemplo, eliminar sustancialmente) la actividad de Luka y LukB, respectivamente.

Los anticuerpos de origen natural tienen típicamente dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, con cada cadena ligera unida covalentemente a una cadena pesada por un enlace disulfuro entre cadenas y múltiples enlaces disulfuro enlazan además las dos cadenas pesadas entre sí. Las cadenas individuales pueden plegarse en dominios que tienen tamaños (110-125 aminoácidos) y estructuras similares, pero diferentes funciones. La cadena ligera puede comprender un dominio variable (VL) y/o un dominio constante (CL). La cadena pesada puede comprender también un dominio variable (VH) y/o, dependiendo de la clase o isotipo del anticuerpo, tres o cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4). En humanos, los isotipos son IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, con IgA e IgG subdivididas en subclases o subtipos (IgA1-2 e IgG1-4).

Generalmente, los dominios variables muestran una considerable variabilidad de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo al siguiente, particularmente en la ubicación del sitio de unión al antígeno. Tres regiones, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) o hipervariables, se encuentran en cada una de VL y VH, que están soportadas por regiones menos variables denominadas regiones variables marco. Los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales IgG, pero los anticuerpos también incluyen fragmentos de anticuerpos o formas manipuladas genéticamente. Estos son, por ejemplo, fragmentos Fv, o proteínas en las que las CDR y/o los dominios variables de los anticuerpos ejemplificados se manipulan genéticamente como proteínas de unión al antígeno de cadena sencilla.

La porción de un anticuerpo que consiste en los dominios VL y VH se designa como Fv (fragmento variable) y constituye el sitio de unión al antígeno. Un Fv de cadena sencilla (scFv o SCA) es un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio VL y un dominio VH en una cadena polipeptídica, en donde el terminal N de un dominio y el terminal C del otro dominio están unidos por un enlazador flexible. Los enlazadores peptídicos utilizados para producir los anticuerpos de cadena sencilla son típicamente péptidos flexibles, seleccionados para asegurar que se produzca un plegamiento tridimensional apropiado de los dominios VL y VH. El enlazador es generalmente de 10 a 50 residuos de aminoácidos, y en algunos casos es más corto, por ejemplo, de aproximadamente 10 a 30 residuos de aminoácidos, o de 12 a 30 residuos de aminoácidos, o incluso de 15 a 25 residuos de aminoácidos. Un ejemplo de tales péptidos enlazadores incluye repeticiones de cuatro residuos de glicina seguidos de un residuo de serina.

Los anticuerpos de cadena sencilla carecen de algunos o todos los dominios constantes de los anticuerpos completos de los que se derivan. Por lo tanto, pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos enteros. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla tienden a estar libres de ciertas interacciones no deseadas

entre regiones constantes de cadena pesada y otras moléculas biológicas. Además, los anticuerpos monocatenarios son considerablemente más pequeños que los anticuerpos enteros y pueden tener una permeabilidad mayor que los anticuerpos completos, permitiendo que los anticuerpos de cadena sencilla se localicen y se unan a los sitios objetivo de unión al antígeno de manera más eficiente. Además, el tamaño relativamente pequeño de los anticuerpos monocatenarios hace menos probable que provoquen una respuesta inmune no deseada en un receptor que los anticuerpos enteros.

Fab (Fragmento, unión al antígeno) se refiere a los fragmentos del anticuerpo que consisten en los dominios VL, CL, VH y CH1. Los generados después de la digestión con papaína simplemente se denominan Fab y no retienen la región de bisagra de cadena pesada. Después de la digestión con pepsina, se generan varios Fab que retiene la bisagra de cadena pesada. Aquellos fragmentos con los enlaces disulfuro entre cadenas intactos se denominan F(ab')₂, mientras que un único Fab' resulta cuando los enlaces disulfuro no se mantienen. Los fragmentos F(ab')₂ tienen una mayor avidéz para el antígeno que los fragmentos Fab monovalentes.

Fc (fragmento de cristalización) es la designación de la porción o fragmento de un anticuerpo que comprende dominios constantes de cadena pesada emparejados. En un anticuerpo IgG, por ejemplo, el Fc comprende los dominios CH2 y CH3. El Fc de un anticuerpo IgA o IgM comprende además un dominio CH4. El Fc está asociado con la unión al receptor Fc, la activación de la citotoxicidad mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Para anticuerpos tales como IgA e IgM, que son complejos de múltiples proteínas similares a IgG, la formación del complejo requiere dominios constantes de Fc.

Finalmente, la región bisagra separa las porciones Fab y Fc del anticuerpo, permitiendo la movilidad de los Fab con relación a los otros y con relación a Fc, así como incluyendo múltiples enlaces disulfuro para el enlace covalente de las dos cadenas pesadas.

La "especificidad" del anticuerpo se refiere al reconocimiento selectivo del anticuerpo por un epítipo particular de un antígeno. El término "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T o bien interactuar con una molécula. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones de superficie químicamente activa de moléculas tales como cadenas laterales de aminoácidos o carbohidratos o azúcar y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítipo puede ser "lineal" o "conformacional". En un epítipo lineal, todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula que interactúa (tal como un anticuerpo) se producen linealmente a lo largo de la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína. En un epítipo conformacional, los puntos de interacción se producen a través de residuos de aminoácidos sobre la proteína que están separados entre sí, es decir, aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos son típicamente retenidos por exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye típicamente al menos 3, y más usualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden verificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser murinos, humanos, humanizados o quiméricos. Un anticuerpo humanizado es una proteína recombinante en la que las CDR de un anticuerpo de una especie, por ejemplo, un anticuerpo de roedor, conejo, perro, cabra, caballo o pollo (o cualquier otro anticuerpo animal adecuado), se transfieren de las cadenas variables pesada y ligera del anticuerpo de roedor a dominios variables ligero y pesado humanos. Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de aquellos de un anticuerpo humano. Los métodos para elaborar anticuerpos humanizados son bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos quiméricos tienen preferiblemente regiones constantes derivadas sustancialmente o exclusivamente de regiones constantes de anticuerpo humano y regiones variables derivadas sustancialmente o exclusivamente de la secuencia de la región variable de un mamífero distinto de un ser humano. El proceso de quimerización puede hacerse más eficaz reemplazando también las regiones variables - distintas de las regiones hipervariables o de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), de un anticuerpo murino (u otro mamífero no humano) con las correspondientes secuencias humanas. Las regiones variables distintas de las CDR también se conocen como las regiones marco variables (FR). Sin embargo, otros anticuerpos monoclonales son biespecíficos, en el sentido de que tienen especificidad tanto por LukA como por LukB. Los anticuerpos biespecíficos son preferentemente humanos o humanizados.

Los anticuerpos descritos anteriormente se pueden obtener de acuerdo con técnicas convencionales. Por ejemplo, LukA, LukB (que como se utilizan aquí estos términos, incluyen análogos no tóxicos de los mismos tales como LukAΔ10C) o un fragmento inmunológicamente activo de LukA o LukB, puede administrarse a un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un humano o un ratón). Las leucocidinas se pueden usar por sí mismas como inmunógenos o pueden unirse a una proteína portadora u otros objetos, tales como perlas, tales como perlas de Sefarosa. Una vez que el mamífero ha producido anticuerpos, se aíslan una mezcla de células productoras de anticuerpos, tales como esplenocitos, a partir de las cuales se pueden obtener anticuerpos policlonales. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse aislando células individuales productoras de anticuerpos de la mezcla e inmortalizándolas, por ejemplo,

fusionándolas con células tumorales, tales como células de mieloma. Los hibridomas resultantes se conservan en cultivo y los anticuerpos monoclonales se recogen del medio de cultivo.

5 Las técnicas para elaborar anticuerpos monoclonales recombinantes son bien conocidas en la técnica. Los anticuerpos policlonales recombinantes pueden producirse mediante métodos análogos a los descritos en la publicación de la solicitud de patente estadounidense No. 2002/0009453, utilizando LukA, LukB o LukAB como el(los) inmunógeno(s).

Composiciones terapéuticas

10 LukA y LukB pueden formularse en una composición terapéutica para uso como un agente antiinflamatorio en el tratamiento de afecciones inflamatorias agudas, incluyendo afecciones inflamatorias agudas localizadas. LukA y LukB también pueden formularse en una composición terapéutica para uso como una vacuna activa. Los anticuerpos anti-LukA y anti-LukB pueden formularse en una composición terapéutica para uso como vacuna pasiva. Las vacunas pasivas y activas pueden usarse en forma profiláctica para inhibir la aparición de una infección por *S. aureus*, o terapéuticamente para tratar la infección por *S. aureus*, particularmente infecciones por *S. aureus* tales como MRSA que se sabe que son refractarias o en el caso del sujeto específico, han demostrado ser refractarias al tratamiento con otros antibióticos convencionales.

15 En las realizaciones en las que la composición terapéutica está destinada para su uso como vacuna activa, el LukA y/o el LukB pueden alterarse de modo que muestren una toxicidad reducida. Las alteraciones moleculares se describieron anteriormente. Por lo tanto, pueden usarse análogos no tóxicos de los mismos tales como LukAΔ10C. Los solicitantes creen que los anticuerpos producidos en respuesta al inmunógeno no tóxico neutralizarán el LukA o LukAB nativo, tóxico. Otras alteraciones con el fin de reducir la toxicidad de LukA y LukB incluyen tratamiento químico (por ejemplo, modificación de residuos de aminoácidos específicos) o conjugación con otra unidad estructural (por ejemplo, con otro antígeno bacteriano, tal como un polisacárido bacteriano o una glicoproteína bacteriana). Se conocen alteraciones químicas de otras toxinas de *S. aureus* con fines de inactivación o desintoxicación (o reducción de la toxicidad). Los métodos para determinar si una alteración dada reduce la toxicidad de LukA o LukB se conocen en la técnica y/o se describen en la presente memoria.

25 Las composiciones terapéuticas de la presente invención se preparan formulando LukA y LukB con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en la presente memoria, los términos "vehículo farmacéuticamente aceptable" y "excipiente farmacéuticamente aceptable" (por ejemplo, aditivos tales como agentes diluyentes, inmunoestimulantes, adyuvantes, antioxidantes, conservantes y solubilizantes) no son tóxicos para la célula o mamífero que son expuestos a los mismos en las dosificaciones y concentraciones utilizadas. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen agua, por ejemplo, regulada con fosfato, citrato y otro ácido orgánico. Ejemplos representativos de excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden ser útiles en la presente invención incluyen antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; adyuvantes (seleccionados para evitar la toxicidad inducida por el adyuvante, tal como un β-glucano como se describe en la patente estadounidense No. 6.355.625, o un factor de estimulación de colonias de granulocitos (GCSF)); polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS®.

40 Como se describe en otra parte de esta memoria, las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden contener además al menos un agente activo adicional.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden prepararse para almacenamiento mezclando el ingrediente o ingredientes activos que tienen el grado deseado de pureza con el vehículo farmacéuticamente aceptable y el excipiente opcional y/o agente activo adicional, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

45 Usos de las composiciones terapéuticas - Indicaciones de condiciones inflamatorias agudas

50 La inflamación se entiende generalmente como la respuesta biológica protectora para eliminar estímulos invasores dañinos tales como patógenos (por ejemplo, bacterias y virus), células dañadas e irritantes e iniciar la cicatrización. La inflamación se entiende más específicamente como la reacción del tejido vivo vascularizado a la lesión. Como tal, la inflamación es un complejo estereotipado fundamental de reacciones citológicas y químicas de los vasos sanguíneos afectados y tejidos adyacentes en respuesta a una lesión o estimulación anormal causada por un agente físico, químico o biológico. La inflamación por lo general conduce a la acumulación de fluido y células sanguíneas en el sitio de la lesión, y usualmente es un proceso de curación. Sin el proceso inflamatorio, las heridas e infecciones no sanarían, y la destrucción progresiva del tejido pondría en peligro la vida. La inflamación aguda se refiere a la respuesta inicial del cuerpo a estímulos invasores e implica el reclutamiento de plasma y glóbulos blancos (leucocitos) a los tejidos lesionados o infectados. La inflamación prolongada, también conocida como inflamación crónica, implica un cambio

progresivo en el tipo de células inmunes que están presentes en el sitio de la inflamación y se caracteriza por la destrucción simultánea y la curación del tejido del proceso inflamatorio.

5 Sin embargo, la inflamación a veces causa daño, usualmente a través de una disfunción del progreso normal de la inflamación. Enfermedades inflamatorias son aquellas pertenecientes a, caracterizadas por, causantes, resultantes de, o que se ven afectadas por la inflamación. Las "afecciones inflamatorias agudas" tal como se utiliza el término en este documento, y de acuerdo con el lenguaje médico normal, se refieren a estados inflamatorios que tienen un inicio rápido y síntomas severos. La duración del inicio, desde un estado normal del paciente hasta uno en el que los síntomas de inflamación se manifiestan seriamente, generalmente dura hasta aproximadamente 72 horas. Las afecciones inflamatorias agudas deben contrastarse con afecciones inflamatorias crónicas, que son afecciones inflamatorias de larga duración, que denotan una enfermedad que muestra poco cambio o de lenta progresión. La distinción entre condiciones agudas y crónicas es bien conocida por los profesionales médicos.

10 Las células inmunitarias principales implicadas en la fase aguda de la inflamación, así como en los trastornos inflamatorios agudos, incluyen células mononucleares (por ejemplo, monocitos, que en respuesta a la inflamación se diferencian en macrófagos), células dendríticas y neutrófilos (que migran al sitio inflamatorio). Estas células inmunitarias ayudan en la respuesta inflamatoria liberando mediadores inflamatorios tales como histamina, interferón gamma, interleucina 8, leucotrieno B4, óxido nítrico, etc., y mediante la ingesta de bacterias, virus y desechos celulares (un proceso conocido como fagocitosis). Estas células se conocen en la técnica colectivamente como fagocitos.

15 Los solicitantes han descubierto que LukAB ataca y mata fagocitos humanos y que esta citotoxicidad mediada por LukAB es sustancialmente específica para estas células pero no para otras células de mamífero nucleadas. Sin pretender estar sujetos a ninguna teoría particular de operación, los solicitantes creen que el complejo LukA/LukB forma poros en la membrana plasmática de los fagocitos infiltrantes, causando la muerte celular, reduciendo así la inflamación. Por lo tanto, las composiciones antiinflamatorias de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de afecciones inflamatorias agudas en mamíferos tales como seres humanos, independientemente de la causa, por ejemplo, cualquier infección bacteriana o viral, y en realizaciones preferidas, condiciones inflamatorias agudas localizadas. Otros ejemplos de estas afecciones incluyen dermatitis alérgica de contacto, hipersensibilidad aguda, lesión inflamatoria neurológica aguda (por ejemplo, causada por infección aguda), infarto agudo de miocardio, lesión neuronal aguda resultante de la cirugía de derivación cardiopulmonar y afecciones antiinflamatorias agudas localizadas causadas por bacterias o infección viral.

20 En realizaciones preferidas, la afección inflamatoria aguda es una herida infectada en la piel o tejido blando. Las heridas susceptibles de tratamiento con la invención pueden estar en forma de perforaciones, cortes o rasgaduras de los tejidos vivos. Las heridas de la piel pueden penetrar en la epidermis, la dermis o en el caso de las heridas de grosor completo, el tejido subcutáneo. Por lo tanto, las heridas tratables con las composiciones terapéuticas de la presente invención incluyen heridas profundas del esternón, por ejemplo, después de una cirugía a corazón abierto y heridas postoperatorias después de cirugía abdominal y cualquier otro tipo de cirugía. Otras heridas son aquellas que resultan de traumatismos tales como disparos de armas, cuchillos, o cualquier otro objeto capaz de causar un corte o desgarro en la piel. Heridas que surgen como un efecto secundario de la medicación o como un síntoma de diversas patologías (por ejemplo, llagas asociadas con el sarcoma de Kaposi), así como heridas internas (por ejemplo, fisuras anales y heridas o lesiones en el tracto gastrointestinal, como úlceras en el estómago o los intestinos) también pueden ser susceptibles de tratamiento con la presente invención.

25 30 35 Otras afecciones inflamatorias agudas que pueden ser susceptibles de tratamiento con las composiciones terapéuticas de la presente invención incluyen conjuntivitis, iritis, uveítis, retinitis central, otitis externa, otitis media supurativa aguda, mastoiditis, laberintitis, rinitis crónica, rinitis aguda, sinusitis, faringitis, amigdalitis, dermatitis de contacto, dermonecrosis, polineuritis diabética, polimiositis, miositis osificante, artritis degenerativa, artritis reumatoide, periartitis escapulo humeral y osteítis deformante.

40 45 Infecciones por *S. aureus*

La presente invención también proporciona un método para inhibir el inicio o el tratamiento de la infección por *S. aureus* mediante la administración de las composiciones de anticuerpos a un sujeto mamífero que lo necesite. Para los fines de la presente invención, la población de sujetos objetivo incluye mamíferos, tales como seres humanos, que están infectados con, o están en riesgo de ser infectados por *S. aureus*. En algunas realizaciones, el sujeto a tratar está infectado con *S. aureus* incluyendo MRSA, y/o ya ha sido tratado con antibióticos u otros agentes terapéuticos, pero el tratamiento ha fracasado.

50 Cantidades terapéuticamente efectivas

En el contexto del tratamiento de estados inflamatorios agudos, las cantidades de LukA y LukB son terapéuticamente eficaces en el sentido de que el tratamiento puede lograr una o más de una reducción del número de síntomas, una

disminución de la gravedad de al menos un síntoma, o un retraso en el progreso adicional de al menos un síntoma, o incluso un alivio total de la afección inflamatoria aguda.

En el contexto del uso de las composiciones terapéuticas como vacunas pasivas o activas en relación con la infección por *S. aureus*, las cantidades terapéuticamente eficaces de LukA y LukB son también profilácticamente eficaces en el sentido de que la administración de la composición es capaz de conseguir cualquier entre uno o más de la inhibición o prevención de una infección por *S. aureus* en aquellos que están en riesgo, y en términos de sujetos mamíferos infectados con *S. aureus*, una reducción en el número de síntomas, una disminución en la gravedad de al menos un síntoma, o un retraso en la progresión adicional de al menos un síntoma, o incluso un alivio total de la infección.

En términos generales, las cantidades terapéuticamente eficaces de LukA y LukB pueden determinarse de acuerdo con procedimientos estándar, que tienen en cuenta numerosos factores, incluyendo, por ejemplo, las concentraciones de estos agentes activos en la composición, el modo y la frecuencia de administración, la gravedad de la afección inflamatoria aguda o la infección por *S. aureus* a ser tratada (o prevenida), y los detalles del sujeto, tales como la edad, el peso y el estado de salud general y la condición inmunológica. Los lineamientos generales pueden encontrarse, por ejemplo, en las publicaciones de la Conferencia Internacional de Armonización y en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Company, 1990). Un médico puede administrar LukA y LukB hasta que se alcance una dosis que proporcione el efecto profiláctico o terapéutico deseado o requerido. El progreso de esta terapia puede monitorearse fácilmente mediante ensayos convencionales.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de LukA y LukB oscilan típicamente entre 1-400 µg de LukA y LukB, por dosis o diariamente. Preferentemente, las cantidades de LukA y LukB son sustancialmente las mismas. Las cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones de anticuerpos son típicamente al menos de 50 mg de composición por kilogramo de peso corporal (mg/kg), incluyendo al menos 100 mg/kg, al menos 150 mg/kg, al menos 200 mg/kg, al menos 250 mg/kg, al menos 500 mg/kg, al menos 750 mg/kg y al menos 1000 mg/kg, por dosis o diariamente. Las dosis para las composiciones de anticuerpos monoclonales podrían tender a ser más bajas, tal como aproximadamente una décima parte de las composiciones de anticuerpos no monoclonales, tales como al menos aproximadamente 5 mg/kg, al menos aproximadamente 10 mg/kg, al menos aproximadamente 15 mg/kg, al menos aproximadamente 20 mg/kg, o al menos aproximadamente 25 mg/kg.

Modos de Administración

Antes de la administración, las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden esterilizarse, lo cual puede realizarse fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución. Las composiciones terapéuticas se pueden colocar en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón que puede ser perforado por una aguja de inyección hipodérmica.

La composición antiinflamatoria se puede administrar por cualquier número de rutas de acuerdo con la práctica médica aceptada. Los modos preferidos incluyen la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea y percutánea, usando técnicas que son conocidas en la técnica. Pueden preverse otras vías de administración. En el caso de tratamiento de afecciones inflamatorias agudas que están localizadas, se puede preferir la administración no sistémica, en cuyo caso la administración de la composición terapéutica se realiza en o alrededor del sitio de la inflamación aguda.

Terapia de combinación

En algunas realizaciones, la composición terapéutica se administra como parte de una terapia de combinación junto con otro agente activo, dependiendo de la naturaleza de la afección inflamatoria aguda o de la infección por *S. aureus* que se está tratando. Tales agentes activos adicionales incluyen agentes antiinfecciosos, agentes antibióticos y agentes antimicrobianos. Los agentes antiinfecciosos representativos que pueden ser útiles en la presente invención incluyen vancomicina y lisostafina. Los agentes antibióticos representativos y los agentes antimicrobianos que pueden ser útiles en la presente invención incluyen penicilinas resistentes a penicilinasas, cefalosporinas y carbapenemasas, incluyendo vancomicina, lisostafina, penicilina G, ampicilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina, dicloxacilina, cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefradina, cefamandol, cefoxitina, imipenem, meropenem, gentamicina, teicoplanina, lincomicina y clindamicina. Las dosificaciones de estos antibióticos son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, MANUAL DE DIAGNÓSTICO Y TERAPIA DE MERCK, Sección 13, cap. 157, 100ª Ed. (Beers & Berkow, eds., 2004). Los agentes antiinflamatorios, antiinfecciosos, antibióticos y/o antimicrobianos se pueden combinar antes de la administración, o administrarse simultáneamente (como parte de la misma composición o por medio de una composición diferente) o secuencialmente con las composiciones terapéuticas de la presente invención.

La composición de anticuerpo anti-LukA y/o anti-LukB puede ser multivalente ya que contiene también un anticuerpo que se une específicamente a otro antígeno bacteriano (y que opcionalmente neutraliza el otro antígeno bacteriano). Los anticuerpos pueden unirse específicamente a cualquiera de los antígenos descritos en el presente documento en el contexto de las composiciones de vacuna. De este modo, por ejemplo, el otro anticuerpo puede unirse específicamente

5 a polisacáridos o glicoproteínas, incluyendo *S. aureus* Tipo 5, *S. aureus* Tipo 8, *S. aureus* 336, componentes de leucocidina tales como PVL (incluyendo las subunidades PVL individuales, LukS-PV y LukF-PV), subunidades de gamma-hemolisina (HlgA, HlgB y HlgC), LukE o LukD de *S. aureus*, LukM o LukF'-PV de *S. aureus*, ácido lipoteicoico (LTA) y componentes de la superficie microbiana que reconocen proteínas de la molécula de matriz adhesiva (MSCRAMM).

Regímenes de tratamiento

10 Las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden administrarse en una dosis única, o de acuerdo con un protocolo de dosificación múltiple. Por ejemplo, se administran relativamente pocas dosis de la composición terapéutica, tal como una o dos dosis. En las realizaciones que incluyen terapia antibiótica convencional, que generalmente implica múltiples dosis durante un período de días o semanas, los antibióticos se pueden tomar una, dos o tres o más veces diariamente durante un período de tiempo, tal como durante al menos 5 días, 10 días o incluso 14 o más días, mientras que la composición de anticuerpos se administra generalmente sólo una o dos veces. Sin embargo, las diferentes dosificaciones, tiempos de dosificación y cantidades relativas de la composición terapéutica y los antibióticos pueden ser seleccionados y ajustados por un experto en la técnica.

15 Métodos de identificación de inhibidores de la citotoxicidad mediada por LukAB y formas alteradas de LukA y LukB que tienen menos toxicidad

20 Los anticuerpos anti-LukA y anti-LukB, y fragmentos de los mismos, así como otras fracciones terapéuticas potenciales (por ejemplo, moléculas orgánicas pequeñas) pueden usarse en diversos métodos (incluyendo formatos de ensayo o cribados) para evaluar su capacidad para inhibir la citotoxicidad mediada por LukAB. Como se describe más adelante, estos métodos están diseñados para identificar agentes que inhiben algún aspecto de la cascada de eventos que conduce a la citotoxicidad mediada por LukAB y la lisis de fagocitos humanos. Los métodos también están diseñados para identificar formas alteradas de LukA y LukB que poseen toxicidad reducida en relación con sus contrapartes nativas. Los eventos objetivo que forman parte de la cascada incluyen, por ejemplo, la unión de LukA a membranas de fagocito, la unión de LukB a LukA (oligomerización de LukAB) y bloqueo del poro de membrana formado por el oligómero LukAB. Los formatos de ensayo generalmente requieren fagocitos humanos (o porción de los mismos de unión a la membrana de LukAB), medio de cultivo adecuado y LukA purificado o LukA y LukB purificados.

25 La persona experta apreciará que los siguientes protocolos son meramente ilustrativos y que se pueden variar diversos parámetros operativos tales como condiciones de reacción, elección de la etiqueta detectable y los aparatos (por ejemplo, la instrumentación para detección y cuantificación) según se considere apropiado.

30 Los siguientes métodos están en general dirigidos a identificar agentes que inhiben la citotoxicidad de LukAB, sin revelar necesariamente el evento exacto que se ve afectado en la cascada.

35 Para identificar los inhibidores de la citotoxicidad de LukAB, se pueden sembrar en placa fagocitos humanos (por ejemplo, células PMN-HL60) en placas tratadas de cultivo de tejidos de color negro de fondo claro de 384 pozos (Corning) a razón de 5×10^3 células/pozo en un volumen final de 50 μ l de RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS). Las células pueden ser entonces puestas en contacto/mezcladas/reaccionar/tratadas con el compuesto de ensayo/molécula ($\sim 5 \mu$ l/concentraciones diferentes) y luego intoxicadas con LukA y LukB, que en las realizaciones preferidas están sustancialmente purificadas (5 μ l de una solución de $\sim 0,001$ -2 μ M), preferiblemente agregados juntos, en condiciones de cultivo para permitir la intoxicación de los fagocitos por LukA y LukB, por ejemplo, durante 1 hora a 37°C, CO₂ al 5%. Como controles, las células pueden tratarse con medio de cultivo (100% viable) y con 0,1% v/v de Triton X-100 (100% de muerte).

40 En estas realizaciones, las células tratadas como se ha descrito anteriormente pueden incubarse después con un colorante para controlar la viabilidad celular tal como CellTiter (Promega) (que permite la determinación de la viabilidad celular a través de la absorbancia midiendo el número de células viables en un cultivo por cuantificación de la actividad metabólica de las células) y se incuban durante un período de tiempo adicional (por ejemplo, aproximadamente 2 horas a 37°C, CO₂ al 5%). La viabilidad celular puede determinarse, por ejemplo, midiendo la reacción colorimétrica a 492 nm usando un lector de placas, por ejemplo, un lector de múltiples etiquetas Envision 2103 (Perkin-Elmer). Se puede calcular el porcentaje de células viables, por ejemplo utilizando la siguiente ecuación: % Viabilidad = $100 \times [(Ab_{492} \text{Muestra} - Ab_{492} \text{Triton X}) / (Ab_{492} \text{Medio de cultivo del tejido})]$. Un aumento en la viabilidad del 100% sugiere la inhibición de la citotoxicidad de LukAB.

45 Una variación de este ensayo se denomina ensayo de daño a la membrana. En estas realizaciones, las células tratadas como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, hasta e incluyendo el tratamiento de las células con el compuesto/molécula de ensayo y luego intoxicando las células con LukA purificado), pueden incubarse después con un colorante fluorescente impermeable a las células tal como verde SYTOX (0,1 μ M; Invitrogen) (de acuerdo con las instrucciones del fabricante) y se incuban, por ejemplo, durante 15 minutos adicionales a temperatura ambiente en la oscuridad. La fluorescencia, como un indicador de daños en la membrana, puede entonces medirse usando un lector de placas tal

como el lector de múltiples etiquetas Envision 2103 (Perkin-Elmer) a 485 nm de excitación, 535 nm de emisión. Una disminución en la fluorescencia sugiere la inhibición de la citotoxicidad LukAB.

Juntos, estos ensayos facilitan la identificación de compuestos que inhiben o reducen los efectos citotóxicos de LukAB frente a las células de fagocitos humanos.

5 Pueden usarse métodos adicionales, independientemente o conjuntamente, con los métodos descritos anteriormente, particularmente si los métodos anteriores revelan actividad inhibitoria, lo que permitirá a una persona experta en el campo determinar con mayor precisión qué evento en la cascada bioquímica está siendo afectado o atacado por el agente. Estos eventos incluyen la unión de LukA a membranas de fagocitos, unión de LukB a LukA (oligomerización de LukAB) y bloqueo del poro de membrana formado por el oligómero LukAB.

10 Cribado de inhibidores de LukA que se unen a las células objetivo

15 Para cribar inhibidores que bloquean o reducen la unión de LukA a las células objetivo, que se cree que es el primer paso en el proceso de intoxicación, se pueden sembrar en placa fagocitos humanos (por ejemplo, células PMN-HL60) en placas tratadas para cultivo de tejidos de fondo plano de 384 pozos (Corning) a razón de $2,5 \times 10^3$ células/pozo en un volumen final de 50 μ l de RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS). Las células pueden ser luego tratadas con el compuesto/molécula de ensayo ($\sim 5 \mu$ l/concentraciones diferentes) e intoxicadas con 5 μ l de LukA purificado, marcado en forma fluorescente (por ejemplo, FITC, Cy3, Cy5, APC, PE) de una solución de $\sim 0,01$ - 2μ M durante 1 h a 37°C, CO₂ al 5%. Para evaluar la eficacia de los compuestos/moléculas ensayados, se puede medir la fluorescencia asociada a las células como un indicador de la unión de LukA a las células, por ejemplo, utilizando un sistema automatizado de formación de imágenes microscópicas de fluorescencia diseñado para un análisis de alto contenido y cribado de alto contenido (por ejemplo, un lector de HCS Cellomics ArrayScan (Thermo Scientific) (Excitación a 485 nm, Emisión a 535 nm)).

Cribado para inhibidores de oligomerización/interacción de LukA-LukB

25 Para cribar inhibidores que bloquean o reducen la interacción de LukA/LukB que se cree que es el segundo paso en el proceso de intoxicación, se pueden sembrar en placa fagocitos humanos (por ejemplo, células PMN-HL60) en placas tratadas para cultivo de tejidos de fondo plano de 384 pozos (Corning) a razón de $2,5 \times 10^3$ células/pozo en un volumen final de 50 μ l de RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS). Las células pueden ser luego tratadas con el compuesto/molécula de ensayo y luego intoxicadas con una mezcla de LukA purificado y LukB purificado donde LukB está marcado en forma fluorescente con una molécula fluorescente tal como FITC, Cy3, Cy5, APC, PE, y se deja reposar hasta completar el proceso de intoxicación (por ejemplo, durante 1 hora a 37°C, CO₂ al 5%). Para evaluar la eficacia de los compuestos/moléculas ensayados, se puede medir la fluorescencia de LukB-FITC asociada a las células como un indicador de la unión de la interacción LukA/LukB-FITC, usando por ejemplo, un sistema automatizado de formación de imágenes microscópicas de fluorescencia diseñado para un análisis de alto contenido y cribado de alto contenido (por ejemplo, un lector de HCS Cellomics ArrayScan (Thermo Scientific) (Excitación a 485 nm, Emisión a 535 nm)).

35 Cribado para inhibidores de la formación de poros de LukAB

40 Para cribar inhibidores que bloquean o inhiben la formación del poro de LukAB, la molécula efectora que conduce a la lisis celular, se pueden sembrar en placa fagocitos humanos (por ejemplo, células PMN-HL60) en placas tratadas para cultivo de tejidos color negro de fondo claro de 384 pozos (Corning) a razón de $2,5 \times 10^3$ células/pozo en un volumen final de 50 μ l de RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS). Las células pueden ser luego tratadas con el compuesto/molécula de ensayo ($\sim 5 \mu$ l que contienen diferentes concentraciones) y luego se intoxican con LukAB purificado ($\sim 0,001$ - 2μ M) durante 10 minutos a 37°C, CO₂ al 5%. Como controles, se pueden tratar las células PMN-HL60 con medio de cultivo (control negativo) y con Triton X100 al 0,1% v/v (control positivo).

45 Para evaluar directamente los poros de LukAB en la superficie de las células huésped, se puede usar un ensayo de afluencia de bromuro de etidio (EB). EB es un colorante catiónico pequeño que es impermeable en células huésped sanas. Tras la formación de poros catiónicos por LukAB, EB entra en las células y se une al ADN, lo que da lugar a la fluorescencia. La célula tratada de esta manera puede entonces incubarse con EB (5 μ M) durante 5 minutos adicionales a temperatura ambiente en la oscuridad. Para evaluar la eficacia de los compuestos/moléculas ensayados en la inhibición de la formación de poros de LukAB, puede medirse la fluorescencia como un indicador de la formación de poros, usando un lector de placas tal como el lector de múltiples etiquetas Envision 2103 (Perkin-Elmer) a una excitación de 530nm, emisión de 590 nm. Este ensayo facilita la identificación de moléculas que pueden bloquear o inhibir el poro de LukAB, que aliviará la toxicidad mediada por LukAB.

Método para determinar la producción de LukAB por aislados clínicos de *S. aureus* para predecir la gravedad de la infección

Un aspecto aún adicional de la presente invención se refiere a un método para predecir o evaluar la gravedad de una infección por *S. aureus* que implica detectar la presencia o cantidad de LukA y/o LukB, o sus genes correspondientes, en una muestra biológica obtenida de un sujeto infectado. Por lo tanto, la detección de la presencia o de cantidades relativamente elevadas de LukA y/o LukB, o la detección de sus genes correspondientes (por ejemplo, como se muestra en la cepa Newman de *S. aureus*, 4645, y en cepas de MRSA USA300 y USA500) con relación a un control (por ejemplo, las cepas USA100 y USA400 de *S. aureus*) que produce cantidades pequeñas o indetectables de LukA y/o LukB, es indicativa de una infección grave. Con respecto a la detección o presencia de cantidades relativas de LukA y/o LukB, se puede hacer referencia a las ilustraciones de la Fig. 4A. A continuación se describen realizaciones representativas del método.

10 Análisis de inmunotransferencias para determinar los niveles de LukA y LukB

Para determinar los niveles de LukAB (es decir, la producción de LukAB), se obtiene la muestra biológica, por ejemplo, una muestra de fluido (por ejemplo, sangre) o de tejido del sujeto infectado, seguido por la exposición del cultivo a condiciones de cultivo adecuadas para permitir el crecimiento de *S. aureus*, obteniendo el sobrenadante de cultivo, separando las proteínas bacterianas del mismo, identificando LukA y/o LukB, y luego cuantificando LukA y/o LukB. Más específicamente, en una realización, las cepas clínicas aisladas pueden seleccionarse y crecer en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, medio de cultivo 1640 (RPMI, Invitrogen) del Royal Park Memorial Institute suplementado con ácidos Casamino (RPMI + CAS) al 1% bajo condiciones de cultivo adecuadas, por ejemplo, durante 12-18 horas a 37°C con agitación a 180 rpm. Las bacterias pueden ser luego precipitadas por centrifugación y se recolectan los sobrenadantes de cultivo. Los sobrenadantes de cultivo (~ 30 µl) se pueden mezclar luego con 10 µl de regulador SDS - Laemmli y se calienta a 95°C durante 10 minutos. Luego se pueden separar las proteínas, por ejemplo, utilizando geles de SDS-PAGE al 15% y luego transferirlas a un soporte sólido, por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa. Las membranas pueden incubarse luego con anticuerpos dirigidos contra LukA o LukB (por ejemplo, anticuerpos policlonales de conejo), y se puede visualizar la presencia de LukA o LukB mediante la detección de los complejos anticuerpo-LukA/anticuerpo-LukB con un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (por ejemplo, anticuerpo anticonejo conjugado con AlexaFluor-680, Invitrogen). Luego se pueden secar y escanear las membranas, por ejemplo, utilizando un sistema de formación de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR Biosciences) para determinar las cantidades de LukA y LukB. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar la presencia de los genes d LukA y/o LukB.

Para determinar la presencia de los genes que codifican para LukAB, se obtiene la muestra biológica del sujeto infectado, seguido por la exposición del cultivo a condiciones de cultivo adecuadas para permitir el crecimiento del *S. aureus*, extraer el ácido nucleico del *S. aureus* y, a continuación, realizar al menos una ronda de amplificación del ácido nucleico utilizando PCR u otro protocolo de amplificación adecuado, utilizando cebadores específicos para LukA y/o LukB, y detectar LukA y/o LukB. Por tanto, en una realización representativa, después de la preparación inicial de la muestra, las cepas clínicas aisladas pueden crecer en un medio sólido, por ejemplo, caldo de soja triptico (TSB) solidificado con agar al 1,5% a 37°C. Se pueden seleccionar entonces las colonias de *S. aureus* y digerir enzimáticamente, por ejemplo, con 2 mg/ml de lisostafina (AMBI PRODUCTS LLC) en regulador TSM (TRIS 100 mM pH 7, sacarosa 500 mM, MgCl₂ 10 mM) durante 10 minutos a 37°C. Las muestras pueden ser luego centrifugadas, el sobrenadante descartado y el sedimento resuspendido con 100 µl de agua estéril, seguido por ebullición durante cinco minutos a 100°C y centrifugación. El sobrenadante proporciona el material de partida y el molde de ADN para una reacción de amplificación tal como PCR usando cebadores específicos para LukA y/o LukB.

Ejemplos de trabajo

La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos. A menos que se especifique lo contrario, todas las partes son en peso.

45 Ejemplo 1: Expresión y purificación de LukA y LukB recombinantes bajo condiciones nativas: sistema de expresión pMAL

Los genes para LukA y LukB fueron amplificados a partir del ADN de *S. aureus* con Taq polimerasa en la configuración estándar de PCR con una temperatura de 55°C utilizando los siguientes cebadores: 5'-ccc-GTCGAC-tta-TCCTTCTTTAT AAGGTTTATTGTC-3' (SEQ ID NO: 30) y 5'-ccc-GAAGGATTTACATCATCATCATCACAATTCAGCTCATAAAGAC TCTC-3' (SEQ ID NO: 31) para LukA y 5'-CCCCGAAGGATTTCaCATCATCATCATCACAAGATTAATTCTGAAATC AAACAAG-3' (SEQ ID NO: 32) y 5'-ccc-GTCGAC-tta-TTCTTTTCATTATCATTAAAGTACTT-3' (SEQ ID NO: 33) para LukB. Los productos génicos de LukA y LukB se digirieron con Nde1 y Sal1 (New England BioLabs) y se ligaron en el vector pMAL-c4X (New England BioLabs). Los constructos se transformaron en la cepa DH5α de *E. coli* y los insertos del plásmido se confirmaron mediante secuenciación. Los transformantes se cultivaron en Caldo Terrific con 100 µg/ml de ampicilina y 0,2% de glucosa a 37°C hasta que los cultivos alcanzaron una A₆₀₀ de ~0,5. La expresión de MBP-LukA etiquetado con 6-his o MBP-LukB etiquetado con 6-his se indujo con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido 0,3 mM (IPTG) a 16°C, durante la noche, con agitación a 180 rpm.

Después de la inducción, se recogieron las células a través de centrifugación a 4000 rpm a 4°C durante 20 min y se resuspendieron en regulador de columna enfriado con hielo (Tris-HCl 20 mM, NaCl 200 mM, y EDTA 1 mM) suplementado con inhibidor de proteasa libre de EDTA (Roche). Las células bacterianas se sonicaron sobre hielo durante 1 minuto (pulsos de 10 segundos). Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm a 4°C durante 30 min y se recogió el sobrenadante y se lo aplicó a una columna de resina de amilosa. Las columnas se lavaron dos veces con regulador de columna y se eluyeron MBP-LukA etiquetado con 6-his o MBP-LukB etiquetado con 6-his purificados en 10 fracciones con regulador de columna suplementado con maltosa 10 mM.

Ejemplo 2: Expresión y purificación de las toxinas LukA, LukA Δ 10C, Δ 33NLukA y LukB activas recombinantes: sistema de expresión pET14b

Los genes para LukA, LukA Δ 10C, Δ 33NLukA y LukB fueron amplificados a partir del ADN de *S. aureus* con polimerasa Vent (New England Biolabs) bajo configuraciones estándar de PCR con una temperatura de 55°C usando los siguientes cebadores: 5'-cccc-CTCGAG-AATTCAGCTCATAAAGACTCTCAAG-3' (SEQ ID NO: 34) y 5'-cccc-GGATCC-tta-TCCTTCTTTATAAGGTTTATTGTC-3' (SEQ ID NO: 35) para LukA; 5'-cccc-CTCGAG-AATTCAGCTCATAAAGACTCTCAAG (SEQ ID NO: 34) y 5'-cccc-GGATCC-tta-ATATTTATCAACGACTTTAACTG (SEQ ID NO: 36) para LukA Δ 10C; 5'-cccc-CTCGAG-TCAACAGCACCGGATGATATTG (SEQ ID NO: 37) y 5'-cccc-GGATCC-tta-TCCTTCTTTATAAGGTTTATTGTC (SEQ ID NO: 35) para Δ 33NLukA; 5'-cccc-CTCGAG-AAGATTAATTCTGAAATCAAACAAG-3' (SEQ ID NO: 38) y 5'-cccc-GGATCC-tta-TTTCTTTTCATTATCATTAAAGTACTTT-3' (SEQ ID NO: 39) para LukB. Los productos génicos se digirieron con Xho1 y BamH1 (New England BioLabs) y se ligaron al vector pET14b (Novagen) fusionando la secuencia codificante de una etiqueta de histidina a la región 5' de los genes. Los plásmidos de expresión se transformaron en la cepa DH5 α de *E. coli* y los insertos plasmídicos se confirmaron mediante secuenciación. Los plásmidos se purificaron y transformaron en la expresión de la cepa T7 lysY/lq de *E. coli* (New England BioLabs).

Para la purificación en condiciones desnaturizantes, se cultivaron los transformantes en Caldo Terrific con 100 μ g/ml de ampicilina a 37°C hasta que los cultivos alcanzaron una A₆₀₀ de ~0,5. La expresión de LukA etiquetado con 6-his o LukB etiquetado con 6-his fue inducida con IPTG 0,4 mM a 37°C, durante 3 h, con agitación a 180 rpm. Después de la inducción, se recolectaron las células a través de centrifugación a 4000 rpm a 4°C durante 15 min y luego se resuspendieron en TBS 1X (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Las células bacterianas se sonicaron en hielo durante 2 min (pulsos de 10 segundos). Las bacterias sonicadas se ultracentrifugaron durante 30 min a 50.000 rpm. Los sedimentos se resuspendieron en regulador de lisis (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, urea 8 M, pH 8,0) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min con movimiento tipo asador. Las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 min y se aplicaron los sobrenadantes en una columna que contenía resina Ni-NTA (Qiagen). La columna se lavó dos veces con regulador de lavado (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, urea 8 M, pH 6,3) y se eluyó la proteína de la columna usando regulador de elución (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, urea 8 M) a pH 5,9 y a pH 4,5. Se reunieron las fracciones que contenían proteína purificada, determinada por SDS-PAGE, se diluyeron 1:1 en solución salina regulada con Tris (TBS, Tris 500 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,5) y se dializaron en TBS a 4°C durante una noche para eliminar la urea y permitir el nuevo plegamiento. Se cuantificaron LukA etiquetado con 6-his y LukB etiquetado con 6-his purificados usando el kit de ensayo de proteínas BCA de Thermo Scientific Pierce.

Para purificación bajo condiciones nativas, se cultivaron los transformantes en caldo Luria-Bertani con 100 μ g/ml de ampicilina a 37°C hasta que los cultivos alcanzaron una A₆₀₀ de ~0,5. Se indujo la expresión de LukA etiquetado con 6-his, LukA Δ 10C etiquetado con 6-his, Δ 33NLukA etiquetado con 6-his o LukB etiquetado con 6-his, con IPTG 0,05-0,1 mM a 25-30°C, durante 3 horas, con agitación a 220 rpm. Después de la inducción, se recolectaron las células a través de centrifugación a 4000 rpm a 4°C durante 15 min y después se resuspendieron en 1X TBS (Tris 50 mM, NaCl 600 mM, pH 7,5) con imidazol 10 mM y un cóctel HALT de inhibidor de proteasa libre de EDTA (Thermo Scientific). Se sonicaron las células bacterianas sobre hielo. Las bacterias sonicadas se centrifugaron durante 20 minutos a 20.000 rpm. Los sobrenadantes se incubaron con resina Ni-NTA (Qiagen) durante 1 hora a 4°C con un movimiento tipo asador. Las muestras se aplicaron a una columna y se lavó la columna con regulador de lavado 1X TBS (Tris 50 mM, NaCl 600 mM, pH 7,5) con imidazol 25 mM. Se eluyó la proteína de la columna usando imidazol 50-500 mM en regulador de elución 1X TBS (Tris 50 mM, NaCl 600 mM, pH 7,5). Se reunieron las fracciones que contenían proteína purificada, como se determinó por SDS-PAGE, se diluyeron 1:1 en 1X TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) y se dializaron en 1X TBS a 4°C durante la noche. Se cuantificaron LukA y LukB etiquetados con 6-his purificados usando el kit de ensayo de proteínas BCA de Thermo Scientific Pierce.

Ejemplo 3: Expresión y purificación de LukA y LukB recombinantes desnaturizados

Los genes para LukA y LukB se amplificaron a partir del ADN de *S. aureus* con la polimerasa Vent (New England BioLabs) en condiciones estándar de PCR con una temperatura de hibridación de 55°C usando los cebadores siguientes: 5'-ggg-CATATG-AATTCAGCTCATAAAGACTCTCAA-3' (SEQ ID NO: 40) y 5'-ccc-GTCGAC-TCCTTCTTTAT AAGGTTTATTGTC-3' (SEQ ID NO: 41) para LukA y 5'-ggg-CATATG-AAGATTAATTCTGAAATCAAACAAG-3' (SEQ ID NO: 42) 5'-ccc-GTCGAC-TTTCTTTTCATTATCATTAAAGTACTT-3' (SEQ ID NO: 43) para LukB. Los productos génicos de LukA y LukB se digirieron con Nde1 y Sal1 (New England BioLabs) y se ligaron en el vector pET41b (Novagen). Se transformaron primero los constructos en células DH5 α y luego se transformaron en la cepa de expresión ER2566 de *E. coli* (New England BioLabs). Los transformantes se cultivaron en Caldo Terrific con kanamicina, 25 μ g/ml, durante 2,5

horas a 37°C y se indujo la expresión de LukA y LukB con IPTG 0,3 mM a 37°C durante 2 horas con agitación a 180 rpm. Las células se sedimentaron y resuspendieron en 1X TBS (Tris 500 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,5) y se sonicaron en hielo durante 1 minuto (impulsos de 10 segundos). Las bacterias sonicadas se centrifugaron durante 30 minutos a 50.000 rpm.

5 Con el fin de purificar el LukA y el LukB etiquetados con 6-his en el extremo C-terminal en condiciones desnaturalizantes, se resuspendieron los sedimentos en regulador de lisis (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, urea 8 M, pH 8,0) y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con movimiento tipo asador. Las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 min y se aplicaron los sobrenadantes a una columna de Ni-NTA. Las columnas se lavaron dos veces con regulador de lavado (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, pH 6,3) y se eluyeron LukA y LukB de las columnas usando regulador de elución (NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, urea 8 M) a pH 5,9 y a pH 4,5. Se cuantificaron los LukA y el LukB etiquetados con 6-his purificados usando el ensayo de proteínas DC de BioRad.

Ejemplo 4: Producción de anticuerpos policlonales anti-LukA y anti-LukB

15 Se inyectó LukA recombinante desnaturalizado (250 µg) emulsionado en adyuvante completo de Freund (FCA) en conejos blancos de Nueva Zelanda. Los animales fueron reforzados con LukB recombinante (125 µg) emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (FCA) al día veintiuno (21) y al día cuarentainueve (49).

Se inyectó LukB recombinante desnaturalizado (250 µg) emulsionado en adyuvante completo de Freund (FCA) en conejos blancos de Nueva Zelanda. Los animales fueron reforzados con LukA recombinante (125 µg) emulsionado en adyuvante incompleto de Freund (FCA) al día veintiuno (21) y al día cuarentainueve (49).

20 Ejemplo 5: La leucocidina A/B es predominantemente responsable de la muerte mediada por citotoxina de fagocitos humanos a través de la ruptura de la membrana

Líneas celulares utilizadas

25 Como modelo para estudiar cómo LukAB ataca y mata fagocitos humanos, se usaron células HL-60 (ATCC CCL-240, una línea celular promielocítica humana). Las células HL-60 se cultivaron en medio RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) a 37°C con CO₂ al 5%. Para diferenciar las células HL-60 en células semejantes a neutrófilos (PMN-HL60), los cultivos fueron suplementados con dimetilsulfóxido (DMSO) al 1,5% (v/v) y se desarrollaron durante 4 días.

Métodos/ensayos utilizados

Ensayo de toxicidad celular

30 Para evaluar la viabilidad de células de mamífero después de la intoxicación con leucocidina AB (LukAB) de Staphylococcus aureus, se sembraron células PMN-HL60 en placas tratadas con cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pozos (Corning) a razón de 1 x 10⁵ células/pozo en un volumen final de 100 µl de RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS). Las células se intoxicaron durante 2 horas a 37°C, CO₂ al 5% con diluciones en serie de 2 veces del filtrado de cultivo de la cepa Newman de Staphylococcus aureus en un intervalo de 35 20% a 0,16% v/v por triplicado. Los experimentos se realizaron utilizando exoproteínas de una cepa de tipo silvestre y exoproteínas de una cepa carente de LukAB (cepa mutante). Los controles para viabilidad del 100% incluyeron medio de cultivo de tejidos al 20% v/v (RPMI + 10% de suero fetal bovino inactivado por calor) y medio de cultivo de S. aureus al 20% v/v (aminoácidos RPMI + Cas). Se utilizó 0,1% v/v de Triton X-100 como control para la muerte celular al 100%. Después de la intoxicación, se añadieron 10 µl de CellTiter (Promega) a cada pozo y se incubaron las células durante 3 horas adicionales a 37°C, CO₂ al 5%, CellTiter controla las células metabólicamente activas (cambio de color), una propiedad perdida en células muertas. La reacción colorimétrica se midió a 492 nm usando un lector de múltiples etiquetas Envision 2103 de Perkin Elmer. El porcentaje de células viables se calculó usando la siguiente ecuación: % de 40 Viabilidad = 100 x [(Ab₄₉₂Muestra - Ab₄₉₂Triton X) / (Ab₄₉₂Medio de cultivo de tejidos)].

Ensayo de daño a la membrana

45 Un ensayo alternativo para medir la citotoxicidad mediada por LukAB es evaluar la integridad de las membranas de las células huésped. Para ello, se empleó un ensayo de permeabilidad con verde SYTOX (Invitrogen). Las células sanas son impermeables al verde SYTOX, pero se vuelven permeables al tinte una vez que se ha comprometido la integridad de la membrana celular. Dentro de las células, el verde SYTOX se une al ADN y exhibe una fuerte fluorescencia.

50 Para evaluar la integridad de las membranas de las células huésped después de la intoxicación con LukAB o infección ex vivo con cepas de S. aureus, se sembraron células PMN-HL60 en placas tratadas con cultivo de tejidos de fondo plano de 96 pozos (Corning) a razón de 1 x 10⁵ células/pozo en un volumen final de 100 µl de RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS). Las células fueron intoxicadas con diluciones

del filtrado del cultivo de la cepa Newman de *S. aureus* en el intervalo entre el 20% y el 0,16% v/v o infectadas con MOI en el intervalo de 1-100 por triplicado durante 2 horas a 37°C, CO₂ al 5%. Los experimentos se realizaron utilizando una cepa de tipo silvestre y una cepa carente de LukAB (cepa mutante). Los controles para la fluorescencia de fondo incluyeron medio de cultivo de tejidos al 20% v/v (RPMI + 10% de suero fetal bovino inactivado por calor) y medio de cultivo de *S. aureus* al 20% v/v (aminoácidos RPMI + Cas). Después de la intoxicación o infección, se transfirieron las células a una placa de fondo en v de 96 pozos (Corning) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se descartó y los sedimentos se resuspendieron en 100 µl de PBS + verde SYTOX (0,1 µM, Invitrogen). Luego se transfirieron las células a una placa tratada con cultivo de tejidos de color negro de fondo claro de 96 pozos (Corning) y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 10 min. La fluorescencia se midió usando un lector de múltiples etiquetas Envision 2103 de Perkin Elmer (excitación a 485 nm, emisión a 535 nm).

Resultados

LukAB ataca y mata fagocitos primarios humanos

La intoxicación de células mononucleares periféricas humanas primarias (PBMC) (Figura 3a), monocitos, macrófagos, células dendríticas (Figura 3b) y células polimorfonucleares (PMN) (Figura 3c) con sobrenadantes de cultivo filtrados de la cepa Newman de *S. aureus* dio como resultado una muerte celular potente según se examinó mediante el ensayo de toxicidad celular (Figuras 3a-c). La intoxicación de estas células con sobrenadantes de cultivo filtrados de la cepa Newman de *S. aureus* que carece de hemolisina (hla), γ -hemolisina (hlg), leucocidina E/D (LukED) o leucocidina A/B (LukAB) reveló que las exoproteínas de cepas negativas para hla, hlg y LukED son tan citotóxicas como la cepa Newman de tipo silvestre (TS) (tal como se examinó mediante el ensayo de toxicidad celular), lo que indica que ninguna de las leucotoxinas anteriormente descritas producidas por Newman contribuye a la muerte de estas mediada por citotoxinas (Figuras 3a-c). Por el contrario, se observó muy poca muerte celular cuando las células estaban intoxicadas con exoproteínas de la cepa Newman que carecía de LukAB (Δ lukAB). La falta de actividad citotóxica por la cepa Newman que carece de LukAB fue rescatada proporcionando los genes para lukAB en trans en un plásmido (Δ lukAB/pLukAB) (Figura 3c). Es importante destacar que este fenotipo es totalmente dependiente de LukAB según lo determinado mediante la intoxicación de PMN con LukA y LukB recombinantes purificados. Las subunidades individuales no mostraron ninguna citotoxicidad detectable hacia los PMN (Fig. 3d). Por el contrario, la combinación de ambas subunidades dio lugar a una potente citotoxicidad hacia estas células de una manera dependiente de la dosis (Figura 3d). En conjunto, estos resultados demuestran que LukAB es responsable de la capacidad de *S. aureus* para atacar y matar fagocitos humanos primarios, células inmunitarias clave necesarias para proteger al huésped contra agentes infecciosos.

LukAB mata preferentemente las células fagocíticas humanas

La intoxicación de la línea celular de tipo neutrófilo (PMN-HL60) y la línea celular de tipo macrófago (THP1 + PMA) con sobrenadantes de cultivo filtrados de la cepa Newman de *S. aureus* resultó en una muerte celular potente según se examinó mediante el ensayo de toxicidad celular (Figura 3). La intoxicación de estas células con sobrenadantes de cultivo filtrados de *S. aureus* de TS y las cepas mutantes de citotoxinas isogénicas (hla, hlgABC, LukED y LukAB) reveló que LukAB es responsable de la capacidad de *S. aureus* para matar estas células según lo determinado por el ensayo de toxicidad celular (Figuras 4a y 4b). La falta de actividad citotóxica por la cepa Newman que carece de LukAB fue rescatada mediante la transformación de la cepa Newman que carece de LukAB con un plásmido que expresa lukAB (Δ lukAB/pLukAB) (Figura 4c). Las exoproteínas de esta cepa fueron extremadamente citotóxicas tanto para las células PMN-HL60 como para las células THP-1 + PMA, proporcionando una fuerte evidencia de que LukAB es una potente toxina estafilocócica que ataca y mata células humanas.

Para descartar además la contribución de otros factores presentes en el sobrenadante del cultivo de *S. aureus*, se intoxicaron las células PMN-HL60 con LukA o LukB recombinante purificado. Las subunidades individuales no mostraron ninguna citotoxicidad detectable hacia PMN-HL60 (Fig. 3d). Por el contrario, la combinación de ambas subunidades dio lugar a una potente citotoxicidad hacia estas células de una forma dependiente de la dosis (Figura 3d). Además de las células PMN-HL60 y THP-1 + PMA, varias otras líneas celulares humanas que incluyen el progenitor mieloide a partir de las cuales se diferencian las PMN-HL60 (HL60), el progenitor de monocitos a partir del cual se diferencian THP-1 + PMA (THP-1), linfocitos (células HuT y Jurkat) y células epiteliales (293T y HepG2) también se intoxicaron con LukAB recombinante (Figura 4e). Estos resultados demuestran que LukAB preferiblemente ataca y mata células fagocíticas humanas y no tiene ningún efecto sobre linfocitos humanos o células epiteliales. Juntos estos resultados demuestran que LukAB desempeña un papel significativo en la muerte mediada por *S. aureus* de los fagocitos.

LukAB es producido por cepas clínicamente relevantes de *S. aureus*

Los análisis de inmunotransferencias con un anticuerpo policlonal producido contra LukB revelaron que LukB es producido por una serie de cepas estafilocócicas incluyendo cepas de MRSA asociadas con infecciones adquiridas en el hospital y en la comunidad (USA300, 400 y 500, Figura 5a). Es importante destacar que los niveles de LukB están asociados con el fenotipo citotóxico de estas cepas (Figuras 5a y 5b). Las cepas que producen altos niveles de LukB

(por ejemplo, Newman, 4645, USA 500 y USA 300) eran más citotóxicas hacia las células PMN-HL60 que las cepas que producen LukB en forma baja o indetectable (por ejemplo, USA100 y USA400) (Figura 5b). Para investigar el papel de LukAB en cepas de MRSA, se creó un mutante isogénico de LukAB en el clon aislado clínico USA tipo 300 LA (Figura 5c). Como se observó con la cepa Newman, las exoproteínas de la cepa USA300 que carecían de LukAB eran notablemente menos citotóxicas que las exoproteínas de la cepa parental (Figura 5d). Estos datos demuestran que LukAB es una citotoxina importante producida por cepas de MRSA.

LukAB daña las membranas de los fagocitos humanos

La intoxicación de PMN-HL60 con exoproteínas de *S. aureus* dio como resultado el redondeo e hinchamiento nuclear de las células, un fenotipo dependiente de LukAB (Figura 6a). Este fenotipo de redondeo e hinchamiento de la célula se asoció con una mayor permeabilidad de la membrana según se determinó mediante el ensayo de daño a la membrana (Figuras 6b y 6c). Es importante destacar que las exoproteínas de la cepa negativa para LukAB mostraron poco o ningún efecto sobre la permeabilidad de la membrana, un fenotipo que fue rescatado produciendo LukAB a partir de un plásmido (Figura 6b) y LukAB recombinante, pero las subunidades individuales de toxina no causan daño a la membrana en una forma dependiente de la dosis (Figura 6c). Además, la infección de PMN primarios humanos tanto con una cepa de *S. aureus* sensible a la meticilina (MSSA) como con una cepa USA300 de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) dio como resultado un daño a la membrana dependiente de LukAB (Figura 6d). Estos resultados demuestran que LukAB daña la membrana plasmática de las células huésped durante la infección ex vivo.

LukAB protege a *S. aureus* de la muerte mediada por el huésped, atacando y matando fagocitos.

La infección de células PMN-HL60 con *S. aureus* TS, Δ lukAB y el Δ lukAB que albergaba el plásmido de expresión lukAB (Δ lukAB/pLukAB) reveló que se requiere LukAB para que la capacidad de *S. aureus* rompa la membrana de los fagocitos durante la interacción estafilococo-fagocito (Fig. 7a), como se determina por el ensayo de daño a la membrana. Es importante destacar que *S. aureus* que produce un exceso de LukAB (Δ lukAB/plukAB) exhibió más daño a la membrana que la cepa de TS (Figura 7a) demostrando que LukAB daña potently las membranas de las células huésped. La infección de sangre entera humana (Figura 7b) y los neutrófilos humanos primarios purificados (PMN, Figura 7c) reveló que el estafilococo negativo para lukAB mataba más eficientemente en comparación con la cepa de TS (Figuras 7b y 7c). Es importante destacar que el fenotipo atenuado exhibido por el estafilococo negativo para Δ lukAB fue rescatado con el plásmido de expresión lukAB (Figuras 7b y 7c). La intoxicación de los PMN primarios humanos con el filtrado del cultivo de *S. aureus* de TS, Δ lukAB, y la cepa mutante Δ lukAB que contiene el plásmido de expresión lukAB reveló que LukAB ataca y mata PMN primarios humanos (Figura 7d). Estos datos indican fuertemente que LukAB es una potente citotoxina estafilocócica que ataca y mata PMN a través de la ruptura de la membrana, protegiendo así a *S. aureus* de la muerte mediada por PMN.

LukAB contribuye a la patogénesis de *S. aureus* in vivo

Los ratones infectados en forma retro-orbital con *S. aureus* que contenían un constructo informador de luciferasa con el promotor de LukAB fusionado a él (pLukAB-Xen1) mostraron actividad del promotor de LukAB en abscesos de riñón, donde como informador sin promotor (pXen1) no mostró actividad (Fig. 8a). Estos datos demuestran que LukAB se expresa in vivo en un modelo de absceso renal de la infección. Además, los ratones infectados en forma retro-orbital con *S. aureus* de TS pero no una cepa de *S. aureus* carente de LukAB mostraron una colonización extensa de los riñones. El defecto de colonización observado en la cepa negativa para LukAB se restableció a los niveles de TS proporcionando LukAB in trans (Figura 8b). Juntos, estos datos muestran que LukAB es una importante citotoxina estafilocócica que contribuye a la patogénesis de la bacteria.

LukAB forma poros en la membrana celular objetivo que pueden ser bloqueados con polietilenglicol

La intoxicación de células PMN-HL60 con LukAB recombinante (rLukAB) reveló que tanto rLukA como rLukB se unen a células objetivo según se determinó mediante inmunotransferencia con anticuerpos específicos LukA y LukB (Figura 9a). También se confirmó la unión de rLukAB etiquetado con 6-His a PMN-HL60 usando clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) y un anticuerpo específico de His (Figura 9b). Los oligómeros de rLukAB también se detectaron mediante inmunotransferencia en membranas de PMN-HL60 después de intoxicación con la toxina recombinante, lo que indica que LukAB forma estructuras de orden superior en las membranas de células objetivo (Figura 9c). Es importante destacar que la intoxicación de PMN-HL60 con rLukAB demostró que LukAB forma poros permeables al bromuro de etidio en las membranas de células objetivo que pueden bloquearse usando moléculas de polietilenglicol (PEG) (Figura 9d), y que el bloqueo de los poros de LukAB aumenta la viabilidad de las células (Figura 9e). Además, los PEG bloquean específicamente los poros de LukAB, ya que los poros formados en las membranas de PMN-HL60 por la saponina no fueron bloqueados por los PEG y como resultado estas células no estaban protegidas de la muerte mediada por los poros. Estos datos demuestran que los poros de LukAB pueden ser bloqueados por moléculas pequeñas y el bloqueo de los poros de LukAB protege a las células de la muerte mediada por LukAB.

Neutralización de la citotoxicidad del filtrado del cultivo de *S. aureus* con un anticuerpo policlonal α -LukA.

La intoxicación de PMN-HL60 con el filtrado de cultivo de *S. aureus* incubado previamente con diversas cantidades de anticuerpos policlonales α -LukA generada en dos conejos diferentes dio como resultado una toxicidad disminuida del filtrado del cultivo en una forma dependiente de la dosis (Figura 10). Este efecto neutralizante no se observó cuando el filtrado del cultivo se incubó previamente con suero preinmune. Es importante destacar que los anticuerpos generados en los dos conejos diferentes se comportaron de manera muy similar y las capacidades de neutralización de los anticuerpos aumentaron con la madurez como se observó comparando el efecto neutralizante del anticuerpo de los sangrados tardíos con el efecto neutralizante del anticuerpo de los sangrados tempranos (Figura 10). Estos datos muestran que la citotoxicidad observada con el filtrado de cultivo de *S. aureus* puede neutralizarse con anticuerpos policlonales α -LukA.

10 Identificación de un mutante de truncamiento de LukA no citotóxico que todavía es reconocido por el anticuerpo policlonal α -LukA.

LukA difiere de las otras subunidades S de leucotoxina estafilocócica en que tiene una extensión tanto en el extremo N-terminal como en el extremo C-terminal. Esta extensión consta de 33 aminoácidos en el extremo N-terminal y 10 aminoácidos en el extremo C-terminal (Figura 11a). La intoxicación de PMN-HL60 con LukA recombinante purificado que carecía de la extensión del N-terminal (r Δ 33NLukA) en combinación con rLukB purificado dio como resultado una potente citotoxicidad hacia las células comparable a la de rLukA + rLukB purificado (Figura 11b). Sin embargo, la intoxicación de PMN-HL60 con LukA recombinante purificado carente de la extensión C-terminal (rLukA Δ 10C) en combinación con rLukB dio como resultado un efecto no citotóxico (Figura 11b). Estos datos demuestran que la extensión N-terminal es dispensable para el efecto citotóxico de LukA, pero la extensión C-terminal es necesaria para la toxicidad. Es importante destacar que el anticuerpo policlonal α -LukA que neutraliza el efecto de LukAB (Figura 10) todavía reconoce al mutante rLukA Δ 10C no citotóxico etiquetado con 6xHis, así como al anticuerpo policlonal α -His (Figura 11c). Estos datos sugieren que rLukA Δ 10C puede explotarse para generar anticuerpos policlonales α -LukA in vivo que son anticuerpos neutralizantes. Por lo tanto, rLukA Δ 10C puede usarse en una composición de vacuna activa.

25 Todas las publicaciones de patentes y publicaciones que no son de patentes son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

Aunque la invención ha sido descrita con referencia a realizaciones particulares, debe entenderse que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios y aplicaciones de la presente invención. Por lo tanto, debe entenderse que pueden realizarse numerosas modificaciones en las realizaciones ilustrativas y que pueden idearse otras disposiciones sin apartarse del alcance de la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

30 Listado de secuencias

<110> Torres, Víctor J. Dumont, Ashley L.

<120> STAPHYLOCOCCUS AUREUS LEUKOCIDINS, THERAPEUTIC COMPOSITIONS, AND USES THEREOF

<130> NYU 3.0-001 and NYU 3.4-001

<140> a ser asignado

35 <141> a ser asignado

<150> US 61/331.550

<151> 2010-05-05

<160> 49

<170> PatentIn versión 3.5

40 <210> 1

<211> 351

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (63)..(63)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

5 <221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (342)..(351)

<223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos.

<400> 1

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala
1 5 10 15

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

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln
35 40 45

Lys Glu Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Xaa Pro
50 55 60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val
65 70 75 80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile
85 90 95

ES 2 605 476 T3

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly
 100 105 110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn
 115 120 125

Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val
 130 135 140

Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys
 145 150 155 160

Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly
 165 170 175

Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr
 180 185 190

Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser
 195 200 205

Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp
 210 215 220

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe
 225 230 235 240

Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe
 245 250 255

Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro
 260 265 270

Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln
 275 280 285

Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Arg Pro
 290 295 300

Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln
 305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys
 325 330 335

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly
 340 345 350

<210> 2

<211> 351

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

5

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (342)..(351)

<223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos.

<400> 2

ES 2 605 476 T3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala
 1 5 10 15

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

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln
 35 40 45

Lys Asp Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Ala Pro
 50 55 60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val
 65 70 75 80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile
 85 90 95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly
 100 105 110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn
 115 120 125

Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val
 130 135 140

Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys
 145 150 155 160

Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly
 165 170 175

Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr
 180 185 190

ES 2 605 476 T3

Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser
 195 200 205

Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp
 210 215 220

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe
 225 230 235 240

Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe
 245 250 255

Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro
 260 265 270

Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln
 275 280 285

Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Arg Pro
 290 295 300

Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln
 305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys
 325 330 335

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly
 340 345 350

<210> 3

<211> 351

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (342)..(351)

<223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos.

10 <400> 3

ES 2 605 476 T3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Phe Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Asn Thr Glu Ala Asn Ser Ala Asn Lys
20 25 30

Asp Ser Gln Asp Gln Thr Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ala Gln Gln

ES 2 605 476 T3

	35		40		45														
Lys	Glu	Lys	Arg	Asn	Val	Asn	Asp	Lys	Asp	Lys	Asn	Thr	Pro	Gly	Pro				
	50					55					60								
Asp	Asp	Ile	Gly	Lys	Asn	Gly	Lys	Val	Thr	Lys	Arg	Thr	Val	Ser	Glu				
65					70					75					80				
Tyr	Asp	Lys	Glu	Thr	Asn	Ile	Leu	Gln	Asn	Leu	Gln	Phe	Asp	Phe	Ile				
				85					90					95					
Asp	Asp	Pro	Thr	Tyr	Asp	Lys	Asn	Val	Leu	Leu	Val	Lys	Lys	Gln	Gly				
			100					105					110						
Ser	Ile	His	Ser	Asn	Leu	Lys	Phe	Glu	Ser	His	Arg	Asn	Glu	Thr	Asn				
		115					120					125							
Ala	Ser	Trp	Leu	Lys	Tyr	Pro	Ser	Glu	Tyr	His	Val	Asp	Phe	Gln	Val				
	130					135					140								
Gln	Arg	Asn	Pro	Lys	Thr	Glu	Ile	Leu	Asp	Gln	Leu	Pro	Lys	Asn	Lys				
145					150					155					160				
Ile	Ser	Thr	Ala	Lys	Val	Asp	Ser	Thr	Phe	Ser	Tyr	Ser	Leu	Gly	Gly				
				165					170					175					
Lys	Phe	Asp	Ser	Thr	Lys	Gly	Ile	Gly	Arg	Thr	Ser	Ser	Asn	Ser	Tyr				
			180					185					190						
Ser	Lys	Ser	Ile	Ser	Tyr	Asn	Gln	Gln	Asn	Tyr	Asp	Thr	Ile	Ala	Ser				
		195				200						205							
Gly	Lys	Asn	Asn	Asn	Arg	His	Val	His	Trp	Ser	Val	Val	Ala	Asn	Asp				
	210					215					220								
Leu	Lys	Tyr	Gly	Asn	Glu	Ile	Lys	Asn	Arg	Asn	Asp	Glu	Phe	Leu	Phe				
225					230					235					240				
Tyr	Arg	Asn	Thr	Arg	Leu	Ser	Thr	Val	Glu	Asn	Pro	Glu	Leu	Ser	Phe				
				245					250					255					
Ala	Ser	Lys	Tyr	Arg	Tyr	Pro	Ala	Leu	Val	Arg	Ser	Gly	Phe	Asn	Pro				
			260				265						270						
Glu	Phe	Leu	Thr	Tyr	Ile	Ser	Asn	Glu	Lys	Ser	Asn	Glu	Lys	Thr	Arg				
		275					280					285							

ES 2 605 476 T3

Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Lys Pro
290 295 300

Gly Ile His Tyr Gly Gln Pro Ile Leu Glu Gln Asn Lys Asp Gly Gln
305 310 315 320

Arg Phe Ile Val Val Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys
325 330 335

Val Val Glu Lys Tyr Ser Asp Gln Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly
340 345 350

<210> 4

<211> 350

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (342)..(350)

10 <223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos. Se suprimió un aminoácido adicional del extremo C-terminal y no se muestra.

<400> 4

ES 2 605 476 T3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala
 1 5 10 15

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

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln
 35 40 45

Lys Glu Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Val Pro
 50 55 60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val
 65 70 75 80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile
 85 90 95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly
 100 105 110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn
 115 120 125

ES 2 605 476 T3

Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val
 130 135 140

Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys
 145 150 155 160

Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly
 165 170 175

Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr
 180 185 190

Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser
 195 200 205

Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp
 210 215 220

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe
 225 230 235 240

Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe
 245 250 255

Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro
 260 265 270

Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln
 275 280 285

Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Arg Pro
 290 295 300

Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Glu Gly Gln
 305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys
 325 330 335

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asn Lys Ser Phe Arg Glu Gly
 340 345 350

<210> 5

<211> 350

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

5 <222> (342)..(350)

<223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos. Se suprimió un aminoácido adicional del extremo C-terminal y no se muestra.

<400> 5

ES 2 605 476 T3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala
 1 5 10 15

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

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln
 35 40 45

Lys Asp Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Ala Pro
 50 55 60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val
 65 70 75 80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile
 85 90 95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly
 100 105 110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn
 115 120 125

Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val
 130 135 140

Lys Arg Asn Pro Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys
 145 150 155 160

Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly
 165 170 175

Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr
 180 185 190

Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser
 195 200 205

Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp
 210 215 220

ES 2 605 476 T3

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe
 225 230 235 240

Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe
 245 250 255

Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro
 260 265 270

Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln
 275 280 285

Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Arg Pro
 290 295 300

Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Glu Gly Gln
 305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys
 325 330 335

Val Val Asp Lys Tyr Thr Asp Asn Lys Ser Phe Arg Glu Gly
 340 345 350

<210> 6

<211> 350

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (342)..(350)

10 <223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos. Se suprimió un aminoácido adicional del extremo C-terminal y no se muestra.

<400> 6

ES 2 605 476 T3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala
1 5 10 15

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

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln
35 40 45

Lys Glu Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Val Pro
50 55 60

ES 2 605 476 T3

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile
 85 90 95
 Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly
 100 105 110
 Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn
 115 120 125
 Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val
 130 135 140
 Lys Arg Asn Pro Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys
 145 150 155 160
 Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly
 165 170 175
 Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser
 195 200 205
 Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp
 210 215 220
 Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe
 225 230 235 240
 Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe
 245 250 255
 Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro
 260 265 270
 Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln
 275 280 285
 Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Arg Pro
 290 295 300
 Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Glu Gly Gln
 305 310 315 320

ES 2 605 476 T3

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys
325 330 335

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asn Lys Ser Phe Arg Glu Gly
340 345 350

<210> 7

<211> 351

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (342)..(351)

<223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos.

10 <400> 7

ES 2 605 476 T3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala
 1 5 10 15

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

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln
 35 40 45

Lys Asp Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Val Pro
 50 55 60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val
 65 70 75 80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile
 85 90 95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly
 100 105 110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn
 115 120 125

Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val
 130 135 140

Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys
 145 150 155 160

ES 2 605 476 T3

Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly
 165 170 175

Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr
 180 185 190

Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser
 195 200 205

Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp
 210 215 220

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe
 225 230 235 240

Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe
 245 250 255

Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro
 260 265 270

Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln
 275 280 285

Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Arg Pro
 290 295 300

Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln
 305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys
 325 330 335

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly
 340 345 350

<210> 8

<211> 351

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (342)..(351)

<223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos.

<400> 8

ES 2 605 476 T3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala
 1 5 10 15

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

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln
 35 40 45

Lys Asp Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Val Pro
 50 55 60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val
 65 70 75 80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile
 85 90 95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly
 100 105 110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn
 115 120 125

Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val
 130 135 140

Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys
 145 150 155 160

Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly
 165 170 175

Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr
 180 185 190

Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Lys Tyr Asp Thr Ile Ala Ile
 195 200 205

Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp
 210 215 220

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe
 225 230 235 240

Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe
 245 250 255

ES 2 605 476 T3

Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro
260 265 270

Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln
275 280 285

Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Arg Pro
290 295 300

Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln
305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys
325 330 335

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly
340 345 350

<210> 9

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (342)..(351)

10 <223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos.

<400> 9

ES 2 605 476 T3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala
 1 5 10 15

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

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln
 35 40 45

Lys Asp Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Ala Pro
 50 55 60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val
 65 70 75 80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile
 85 90 95

ES 2 605 476 T3

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly
 100 105 110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn
 115 120 125

Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val
 130 135 140

Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys
 145 150 155 160

Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly
 165 170 175

Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr
 180 185 190

Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser
 195 200 205

Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp
 210 215 220

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe
 225 230 235 240

Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe
 245 250 255

Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro
 260 265 270

Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln
 275 280 285

Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Arg Pro
 290 295 300

Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln
 305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys
 325 330 335

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly
 340 345 350

<210> 10

<211> 351

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

5

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (342)..(351)

<223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos.

<400> 10

ES 2 605 476 T3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Phe Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Asn Thr Glu Ala Asn Ser Ala Asn Lys
 20 25 30
 Asp Ser Gln Asp Gln Thr Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ala Gln Gln
 35 40 45
 Lys Glu Lys Arg Asn Val Asn Asp Lys Asp Lys Asn Thr Pro Gly Pro
 50 55 60
 Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Val Thr Lys Arg Thr Val Ser Glu
 65 70 75 80
 Tyr Asp Lys Glu Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile
 85 90
 Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly
 100 105 110
 Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Arg Asn Glu Thr Asn
 115 120 125
 Ala Ser Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val
 130 135 140
 Gln Arg Asn Pro Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys
 145 150 155 160
 Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Leu Gly Gly
 165 170 175
 Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr
 180 185 190

ES 2 605 476 T3

Ser Lys Ser Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser
 195 200 205

Gly Lys Asn Asn Asn Arg His Val His Trp Ser Val Val Ala Asn Asp
 210 215 220

Leu Lys Tyr Gly Asn Glu Ile Lys Asn Arg Asn Asp Glu Phe Leu Phe
 225 230 235 240

Tyr Arg Asn Thr Arg Leu Ser Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe
 245 250 255

Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro
 260 265 270

Glu Phe Leu Thr Tyr Ile Ser Asn Glu Lys Thr Asn Asp Lys Thr Arg
 275 280 285

Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Lys Pro
 290 295 300

Gly Ile His Tyr Gly Gln Pro Ile Leu Glu Gln Asn Lys Asp Gly Gln
 305 310 315 320

Arg Phe Ile Val Val Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys
 325 330 335

Val Val Glu Lys Tyr Ser Asp Gln Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly
 340 345 350

<210> 11

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (342)..(351)

10 <223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos.

<400> 11

ES 2 605 476 T3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Phe Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Asn Thr Glu Ala Asn Ser Ala Asn Lys
20 25 30

Asp Ser Gln Asp Gln Thr Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ala Gln Gln

ES 2 605 476 T3

Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Val Leu Lys Asn Lys Pro
290 295 300

Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln
305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys
325 330 335

Val Ile Asp Lys Tyr Ser Asp Glu Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly
340 345 350

<210> 12

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (342)..(351)

10 <223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos.

<400> 12

ES 2 605 476 T3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Phe Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Val
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Asn Thr Glu Ala Asn Ser Ala Asn Lys
 20 25 30

Asp Ser Gln Asp Gln Thr Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ala Gln Gln
 35 40 45

Lys Glu Lys Arg Asn Val Asn Asp Lys Asp Lys Asn Thr Pro Gly Pro
 50 55 60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Val Thr Lys Arg Thr Val Ser Glu
 65 70 75 80

Tyr Asp Lys Glu Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile
 85 90 95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly
 100 105 110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Arg Asn Glu Thr Asn
 115 120 125

Ala Ser Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val

ES 2 605 476 T3

130	135	140																	
Gln	Arg	Asn	Pro	Lys	Thr	Glu	Ile	Leu	Asp	Gln	Leu	Pro	Lys	Asn	Lys	145	150	155	160
Ile	Ser	Thr	Ala	Lys	Val	Asp	Ser	Thr	Phe	Ser	Tyr	Ser	Leu	Gly	Gly	165	170	175	
Lys	Phe	Asp	Ser	Thr	Lys	Gly	Ile	Gly	Arg	Thr	Ser	Ser	Asn	Ser	Tyr	180	185	190	
Ser	Lys	Ser	Ile	Ser	Tyr	Asn	Gln	Gln	Asn	Tyr	Asp	Thr	Ile	Ala	Ser	195	200	205	
Gly	Lys	Asn	Asn	Asn	Arg	His	Val	His	Trp	Ser	Val	Val	Ala	Asn	Asp	210	215	220	
Leu	Lys	Tyr	Gly	Asn	Glu	Ile	Lys	Asn	Arg	Asn	Asp	Glu	Phe	Leu	Phe	225	230	235	240
Tyr	Arg	Asn	Thr	Arg	Leu	Ser	Thr	Val	Glu	Asn	Pro	Glu	Leu	Ser	Phe	245	250	255	
Ala	Ser	Lys	Tyr	Arg	Tyr	Pro	Ala	Leu	Val	Arg	Ser	Gly	Phe	Asn	Pro	260	265	270	
Glu	Phe	Leu	Thr	Tyr	Ile	Ser	Asn	Glu	Lys	Ser	Asn	Glu	Lys	Thr	Arg	275	280	285	
Phe	Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Arg	Asn	Gln	Asp	Ile	Leu	Lys	Asn	Lys	Pro	290	295	300	
Gly	Ile	His	Tyr	Gly	Gln	Pro	Ile	Leu	Glu	Gln	Asn	Lys	Asp	Gly	Gln	305	310	315	320
Arg	Phe	Ile	Val	Val	Tyr	Glu	Val	Asp	Trp	Lys	Asn	Lys	Thr	Val	Lys	325	330	335	
Val	Val	Glu	Lys	Tyr	Ser	Asp	Gln	Asn	Lys	Pro	Tyr	Lys	Glu	Gly		340	345	350	

<210> 13

<211> 351

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (342)..(351)

<223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos.

5 <400> 13

ES 2 605 476 T3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Phe Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Asn Thr Glu Ala Asn Ser Ala Asn Lys
20 25 30

Asp Ser Gln Asp Gln Thr Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ala Gln Gln
35 40 45

Lys Glu Lys Arg Asn Val Asn Asp Lys Asp Lys Asn Thr Pro Gly Pro
50 55 60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Val Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val
65 70 75 80

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile
85 90 95

Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Ile Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly
100 105 110

Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Asn Asn
115 120 125

Ser Ser Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val
130 135 140

Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys
145 150 155 160

Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Asn Ser Gly Gly
165 170 175

Lys Phe Asp Ser Val Lys Gly Val Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr
180 185 190

Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser
195 200 205

Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Val Ala Asn Asp
210 215 220

Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Phe Leu Phe

ES 2 605 476 T3

225					230						235				240
Tyr	Arg	Thr	Thr	Arg	Leu	Ser	Thr	Val	Glu	Asn	Pro	Glu	Leu	Ser	Phe
				245					250					255	
Ala	Ser	Lys	Tyr	Arg	Tyr	Pro	Ala	Leu	Val	Arg	Ser	Gly	Phe	Asn	Pro
			260					265					270		
Glu	Phe	Leu	Thr	Tyr	Leu	Ser	Asn	Glu	Lys	Ser	Asn	Glu	Lys	Thr	Gln
		275					280					285			
Phe	Glu	Val	Thr	Tyr	Thr	Arg	Asn	Gln	Asp	Ile	Leu	Lys	Asn	Lys	Pro
	290					295					300				
Gly	Ile	His	Tyr	Ala	Pro	Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Asn	Lys	Asp	Gly	Gln
305					310					315					320
Arg	Leu	Ile	Val	Thr	Tyr	Glu	Val	Asp	Trp	Lys	Asn	Lys	Thr	Val	Lys
				325					330					335	
Val	Ile	Asp	Lys	Tyr	Ser	Asp	Asp	Asn	Lys	Pro	Tyr	Lys	Glu	Gly	
			340					345					350		

<210> 14

<211> 351

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (342)..(351)

<223> Los aminoácidos correspondientes a aquellos residuos pueden faltar/ser suprimidos.

10 <400> 14

ES 2 605 476 T3

Met Lys Asn Lys Lys Arg Val Leu Ile Ala Ser Ser Leu Ser Cys Ala
1 5 10 15

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

Asp Ser Gln Asp Gln Asn Lys Lys Glu His Val Asp Lys Ser Gln Gln
35 40 45

Lys Asp Lys Arg Asn Val Thr Asn Lys Asp Lys Asn Ser Thr Val Pro
50 55 60

Asp Asp Ile Gly Lys Asn Gly Lys Ile Thr Lys Arg Thr Glu Thr Val
65 70 75 80

ES 2 605 476 T3

Tyr Asp Glu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Asn Leu Gln Phe Asp Phe Ile
 85 90 95
 Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu Val Lys Lys Gln Gly
 100 105 110
 Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His Lys Glu Glu Lys Asn
 115 120 125
 Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His Val Asp Phe Gln Val
 130 135 140
 Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Asn Lys
 145 150 155 160
 Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser Tyr Ser Ser Gly Gly
 165 170 175
 Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr Ser Ser Asn Ser Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Asp Thr Ile Ala Ser
 195 200 205
 Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser Val Ile Ala Asn Asp
 210 215 220
 Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn Asp Glu Leu Leu Phe
 225 230 235 240
 Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn Pro Glu Leu Ser Phe
 245 250 255
 Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg Ser Gly Phe Asn Pro
 260 265 270
 Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser Asn Glu Lys Thr Gln
 275 280 285
 Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile Leu Lys Asn Arg Pro
 290 295 300
 Gly Ile His Tyr Ala Pro Ser Ile Leu Glu Lys Asn Lys Asp Gly Gln
 305 310 315 320
 Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys Asn Lys Thr Val Lys

ES 2 605 476 T3

325

330

335

Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro Tyr Lys Glu Gly
340 345 350

<210> 15

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 15

ES 2 605 476 T3

Met Ile Lys Gln Leu Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Leu Thr Val Phe Pro Ala Thr Ser Tyr Ala Lys Ile Asn
20 25 30

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr
50 55 60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu
65 70 75 80

Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile
85 90 95

Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser
100 105 110

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val
115 120 125

Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr
130 135 140

Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly
145 150 155 160

Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser
165 170 175

Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His
180 185 190

Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly

ES 2 605 476 T3

195		200		205
His Asp	His Thr Arg	Gln Leu Thr Asn Asp	Ser Asp	Asn Arg Thr Lys
210		215	220	
Ser Glu Ile Phe Ser	Leu Thr Arg Asn Gly	Asn Leu Trp Ala Lys Asp		
225	230	235		240
Asn Phe Thr Pro Lys	Asn Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe			
	245	250		255
Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Lys Gly				
	260	265		270
Lys Ser Gln Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys				
	275	280		285
Ile Asp Trp Asn Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn				
	290	295		300
His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp				
305	310		315	320
Trp Lys Thr His Asn Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu				
	325	330		335

Lys Lys

<210> 16

<211> 339

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 16

ES 2 605 476 T3

Met Ile Lys Gln Val Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Leu Thr Val Phe Pro Ala Ser Ser Tyr Ala Glu Ile Lys
20 25 30

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Thr Glu Lys Lys Ile Ser
50 55 60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu

ES 2 605 476 T3

Asp Trp Lys Thr His Asp Val Lys Leu Ile Lys Thr Phe Asn Asp Lys
325 330 335

Glu Lys Lys

<210> 17

<211> 290

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 17

ES 2 605 476 T3

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr
1 5 10 15

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu
20 25 30

Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile
35 40 45

Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser
50 55 60

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val
65 70 75 80

Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr
85 90 95

Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly
100 105 110

Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser
115 120 125

Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His
130 135 140

Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly
145 150 155 160

His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn Arg Thr Lys
165 170 175

Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp
180 185 190

ES 2 605 476 T3

Asn Phe Thr Pro Lys Asp Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe
195 200 205

Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Lys Gly
210 215 220

Lys Ser Gln Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys
225 230 235 240

Ile Asp Trp Asn Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn
245 250 255

His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp
260 265 270

Trp Lys Thr His Asn Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu
275 280 285

Lys Lys
290

<210> 18

<211> 338

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 18

ES 2 605 476 T3

Met Ile Lys Gln Val Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15

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

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr
 50 55 60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Lys Asn Tyr Asp Lys Glu
 65 70 75 80

Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile
 85 90 95

Leu Glu Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser
 100 105 110

ES 2 605 476 T3

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val
 115 120 125
 Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr
 130 135 140
 Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Gln Gly Gly
 145 150 155 160
 Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser
 165 170 175
 Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Ile Asp Gln Pro Thr Thr Asn
 180 185 190
 Lys Gly Val Ala Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly
 195 200 205
 His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asp Arg Val Lys
 210 215 220
 Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp
 225 230 235 240
 Asn Phe Thr Pro Lys Asn Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe
 245 250 255
 Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Glu Gly
 260 265 270
 Lys Ser Lys Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys
 275 280 285
 Ile Asp Trp Asn Lys His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn
 290 295 300
 His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp
 305 310 315 320
 Trp Lys Thr His Asn Val Lys Phe Ile Lys Val Leu Asn Asp Lys Glu
 325 330 335
 Lys Lys

<211> 339

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 19

ES 2 605 476 T3

Met Ile Lys Gln Val Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Leu Thr Val Phe Pro Ala Ser Ser Tyr Ala Glu Ile Lys
20 25 30

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Thr Glu Lys Lys Ile Ser
50 55 60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu
65 70 75 80

Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Lys Ile
85 90 95

Leu Asn Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Thr Trp Pro Gly Ser
100 105 110

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Ser Thr Asn
115 120 125

Val Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys
130 135 140

Tyr Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly
145 150 155 160

Gly Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Lys Asn Tyr Ser Glu Thr Ile
165 170 175

Ser Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Ile Asp Gln Pro Thr Thr
180 185 190

Asn Lys Gly Val Ala Trp Lys Val Glu Ala His Ser Ile Asn Asn Met
195 200 205

Gly His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asp Arg Val
210 215 220

Lys Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys
225 230 235 240

ES 2 605 476 T3

Asp Asn Phe Thr Pro Lys Asn Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly
245 250 255

Phe Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Asn Asp Lys
260 265 270

Gly Lys Ser Arg Phe Ile Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Asp Phe
275 280 285

Lys Leu Asp Trp Asn Lys His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu
290 295 300

Asn His Val Asp Gln Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val
305 310 315 320

Asp Trp Lys Thr His Asp Val Lys Leu Ile Lys Thr Ile Asn Asp Lys
325 330 335

Glu Gln Lys

<210> 20

<211> 338

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 20

ES 2 605 476 T3

Met Ile Lys Gln Leu Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Thr Leu Ala Leu
 1 5 10 15

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

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr
 50 55 60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu
 65 70 75 80

Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile
 85 90 95

Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser
 100 105 110

ES 2 605 476 T3

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val
 115 120 125
 Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr
 130 135 140
 Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly
 145 150 155 160
 Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser
 165 170 175
 Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His
 180 185 190
 Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly
 195 200 205
 His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn Arg Thr Lys
 210 215 220
 Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp
 225 230 235 240
 Asn Phe Thr Pro Lys Asp Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe
 245 250 255
 Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Lys Gly
 260 265 270
 Lys Ser Gln Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys
 275 280 285
 Ile Asp Trp Asn Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn
 290 295 300
 His Val Asp Glu Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp
 305 310 315 320
 Trp Lys Thr His Asn Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu
 325 330 335
 Lys Lys

<210> 21

<211> 339

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

5 <400> 21

ES 2 605 476 T3

Met Ile Lys Gln Val Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ser Thr Ala Leu Thr Val Phe Pro Ala Ser Ser Tyr Ala Glu Ile Lys
20 25 30

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Thr Glu Lys Lys Ile Ser
50 55 60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu
65 70 75 80

Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Lys Ile
85 90 95

Leu Asn Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser
100 105 110

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Ser Thr Asn
115 120 125

Val Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys
130 135 140

Tyr Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly
145 150 155 160

Gly Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Lys Asn Tyr Ser Glu Thr Ile
165 170 175

Ser Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Ile Asp Gln Pro Thr Thr
180 185 190

Asn Lys Gly Val Ala Trp Lys Val Glu Ala His Ser Ile Asn Asn Met
195 200 205

Gly His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asp Arg Val
210 215 220

Lys Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys
225 230 235 240

ES 2 605 476 T3

Asp Asn Phe Thr Pro Lys Asn Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly
245 250 255

Phe Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Asn Asp Lys
260 265 270

Gly Lys Ser Arg Phe Ile Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Asp Phe
275 280 285

Lys Leu Asp Trp Asn Lys His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu
290 295 300

Asn His Val Asp Gln Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val
305 310 315 320

Asp Trp Lys Thr His Asp Val Lys Leu Ile Lys Thr Ile Asn Asp Lys
325 330 335

Glu Gln Lys

<210> 22

<211> 338

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 22

ES 2 605 476 T3

Met Ile Lys Gln Leu Tyr Lys Asn Ile Thr Ile Cys Ser Leu Ala Ile
 1 5 10 15

Ser Thr Ala Leu Thr Val Phe Pro Ala Thr Ser Tyr Ala Lys Ile Asn
 20 25 30

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr
 50 55 60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu
 65 70 75 80

Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile
 85 90 95

Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser
 100 105 110

ES 2 605 476 T3

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val
 115 120 125
 Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr
 130 135 140
 Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly
 145 150 155 160
 Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser
 165 170 175
 Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His
 180 185 190
 Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly
 195 200 205
 His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn Arg Thr Lys
 210 215 220
 Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp
 225 230 235 240
 Asn Phe Thr Pro Lys Asp Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe
 245 250 255
 Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Lys Gly
 260 265 270
 Lys Ser Gln Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys
 275 280 285
 Ile Asp Trp Asn Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn
 290 295 300
 His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp
 305 310 315 320
 Trp Lys Thr His Asp Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu
 325 330 335
 Lys Lys

<210> 23

<211> 338

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

5 <400> 23

ES 2 605 476 T3

Met Ile Lys Gln Leu Tyr Lys Asn Ile Thr Ile Cys Thr Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ser Thr Thr Phe Thr Val Leu Pro Ala Thr Ser Tyr Ala Lys Ile Asn
20 25 30

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr
50 55 60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu
65 70 75 80

Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile
85 90 95

Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser
100 105 110

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val
115 120 125

Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr
130 135 140

Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly
145 150 155 160

Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser
165 170 175

Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His
180 185 190

Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly
195 200 205

His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn Arg Thr Lys
210 215 220

Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp

ES 2 605 476 T3

225					230						235					240
Asn	Phe	Thr	Pro	Lys	Asn	Lys	Met	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Glu	Gly	Phe	
				245					250					255		
Asn	Pro	Glu	Phe	Leu	Ala	Val	Met	Ser	His	Asp	Lys	Lys	Asp	Glu	Gly	
			260					265					270			
Lys	Ser	Lys	Phe	Val	Val	His	Tyr	Lys	Arg	Ser	Met	Asp	Glu	Phe	Lys	
		275					280					285				
Ile	Asp	Trp	Asn	Arg	His	Gly	Phe	Trp	Gly	Tyr	Trp	Ser	Gly	Glu	Asn	
	290					295					300					
His	Val	Asp	Lys	Lys	Glu	Glu	Lys	Leu	Ser	Ala	Leu	Tyr	Glu	Val	Asp	
305					310					315					320	
Trp	Lys	Thr	His	Asn	Val	Lys	Phe	Val	Lys	Val	Leu	Asn	Asp	Asn	Glu	
				325					330					335		

Lys Lys

<210> 24

<211> 338

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 24

ES 2 605 476 T3

Met Ile Lys Gln Leu Tyr Lys Asn Ile Thr Ile Cys Ser Leu Thr Ile
1 5 10 15

Ser Thr Ala Leu Thr Val Phe Pro Ala Thr Ser Tyr Ala Lys Ile Asn
20 25 30

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr
50 55 60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu
65 70 75 80

Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile
85 90 95

Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser

ES 2 605 476 T3

100 105 110
 Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val
 115 120 125
 Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr
 130 135 140
 Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly
 145 150 155 160
 Leu Pro Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser
 165 170 175
 Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His
 180 185 190
 Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly
 195 200 205
 His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn Arg Thr Lys
 210 215 220
 Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp
 225 230 235 240
 Asn Phe Thr Pro Lys Asn Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe
 245 250 255
 Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Glu Gly
 260 265 270
 Lys Ser Lys Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys
 275 280 285
 Ile Asp Trp Asn Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn
 290 295 300
 His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp
 305 310 315 320
 Trp Lys Thr His Asp Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu
 325 330 335
 Lys Lys

<211> 338

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 25

ES 2 605 476 T3

Met Ile Lys Gln Leu Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Thr Leu Ala Leu
1 5 10 15

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

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr
50 55 60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu
65 70 75 80

Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile
85 90 95

Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser
100 105 110

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val
115 120 125

Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr
130 135 140

Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly
145 150 155 160

Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser
165 170 175

Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His
180 185 190

Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly
195 200 205

His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn Arg Thr Lys
210 215 220

ES 2 605 476 T3

Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp
 225 230 235 240

Asn Phe Thr Pro Lys Asn Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe
 245 250 255

Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Glu Gly
 260 265 270

Lys Ser Lys Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys
 275 280 285

Ile Asp Trp Asn Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn
 290 295 300

His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp
 305 310 315 320

Trp Lys Thr His Asn Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu
 325 330 335

Lys Lys

<210> 26

<211> 338

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 26

ES 2 605 476 T3

Met Ile Lys Gln Leu Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Thr Leu Ala Leu
1 5 10 15

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

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr
50 55 60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu
65 70 75 80

Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile
85 90 95

ES 2 605 476 T3

Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser
 100 105 110
 Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val
 115 120 125
 Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr
 130 135 140
 Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly
 145 150 155 160
 Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser
 165 170 175
 Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His
 180 185 190
 Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly
 195 200 205
 His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn Arg Thr Lys
 210 215 220
 Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp
 225 230 235 240
 Asn Phe Thr Pro Lys Asp Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe
 245 250 255
 Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Lys Gly
 260 265 270
 Lys Ser Gln Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys
 275 280 285
 Ile Asp Trp Asn Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn
 290 295 300
 His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp
 305 310 315 320
 Trp Lys Thr His Asn Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu
 325 330 335
 Lys Lys

<210> 27

<211> 338

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

5 <400> 27

ES 2 605 476 T3

Met Ile Lys Gln Leu Cys Lys Asn Ile Thr Ile Cys Thr Leu Ala Leu
 1 5 10 15

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

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

Met Tyr Thr Arg Thr Ala Thr Thr Ser Asp Ser Gln Lys Asn Ile Thr
 50 55 60

Gln Ser Leu Gln Phe Asn Phe Leu Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Lys Glu
 65 70 75 80

Thr Val Phe Ile Lys Ala Lys Gly Thr Ile Gly Ser Gly Leu Arg Ile
 85 90 95

Leu Asp Pro Asn Gly Tyr Trp Asn Ser Thr Leu Arg Trp Pro Gly Ser
 100 105 110

Tyr Ser Val Ser Ile Gln Asn Val Asp Asp Asn Asn Asn Thr Asn Val
 115 120 125

Thr Asp Phe Ala Pro Lys Asn Gln Asp Glu Ser Arg Glu Val Lys Tyr
 130 135 140

Thr Tyr Gly Tyr Lys Thr Gly Gly Asp Phe Ser Ile Asn Arg Gly Gly
 145 150 155 160

Leu Thr Gly Asn Ile Thr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Glu Thr Ile Ser
 165 170 175

Tyr Gln Gln Pro Ser Tyr Arg Thr Leu Leu Asp Gln Ser Thr Ser His
 180 185 190

Lys Gly Val Gly Trp Lys Val Glu Ala His Leu Ile Asn Asn Met Gly
 195 200 205

His Asp His Thr Arg Gln Leu Thr Asn Asp Ser Asp Asn Arg Thr Lys
 210 215 220

ES 2 605 476 T3

Ser Glu Ile Phe Ser Leu Thr Arg Asn Gly Asn Leu Trp Ala Lys Asp
 225 230 235 240

Asn Phe Thr Pro Lys Asp Lys Met Pro Val Thr Val Ser Glu Gly Phe
 245 250 255

Asn Pro Glu Phe Leu Ala Val Met Ser His Asp Lys Lys Asp Lys Gly
 260 265 270

Lys Ser Gln Phe Val Val His Tyr Lys Arg Ser Met Asp Glu Phe Lys
 275 280 285

Ile Asp Trp Asn Arg His Gly Phe Trp Gly Tyr Trp Ser Gly Glu Asn
 290 295 300

His Val Asp Lys Lys Glu Glu Lys Leu Ser Ala Leu Tyr Glu Val Asp
 305 310 315 320

Trp Lys Thr His Asn Val Lys Phe Val Lys Val Leu Asn Asp Asn Glu
 325 330 335

Lys Lys

<210> 28

<211> 1056

<212> ADN

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 28

atgaaaaata aaaaacgtgt tttaatagcg tcatcattat catgtgcaat tttattgta 60
 tcagcagcaa cgactcaagc aaattcagct cataaagact ctcaagacca aaataagaaa 120
 gaacatggtg ataagtctca acaaaaagac aaacgtaatg ttactaataa agataaaaat 180
 tcaacagcac cggatgatat tgggaaaaac ggtaaaatca caaacgaac tgaaacagta 240
 tatgatgaga aaacaaatat actccaaaat ttacaattcg actttatcga tgatccaact 300
 tatgacaaga atgtattact tgttaaaaaa caaggctcaa ttcattcaaa tttaaagttt 360
 gaatctcata aagaagaaaa aaattcaaat tggttaaagt atccaagtga gtaccatgta 420
 gattttcaag taaaaagaaa tcgtaaaact gaaatattag accaattgcc gaaaaataaa 480
 atttcaactg caaaagtaga cagtacattt tcatatagct caggtggtaa attcgattca 540
 acaaaggta ttggacgaac ttcattcaat agctactcca aaacgattag ttataatcag 600
 caaaattatg acacaattgc cagcggtaaa aataataact ggcatgtaca ctggtcagtt 660
 attgccaatg acttgaagta tgggtggagaa gtgaaaaata gaaatgatga attattattc 720

ES 2 605 476 T3

tatagaaata cgagaattgc tactgtagaa aaccctgaac taagctttgc ttcaaaatat	780
agatacccag cattagtaag aagtggcttt aatccagaat ttttaactta tttatctaata	840
gaaaagtcaa atgagaaaac gcaatttgaa gtaacataca cacgaaatca agatattttg	900
aaaaacagac ctggaatata ttatgcacct ccaatttttag aaaaaataa agatgggtcaa	960
agattaattg tcacttatga agttgattgg aaaaataaaa cagttaaagt cgttgataaa	1020
tattctgatg acaataaacc ttataaagaa ggataa	1056

<210> 29

<211> 1017

5 <212> ADN

<213> Staphylococcus aureus

<400> 29

atgattaaac aactatgtaa aaatatcaca atttgtacgt tagcactatc gactactttc	60
actgtattac cagctacttc atttgcaaag attaattctg aatcaaaca agtttctgag	120
aagaatcttg atggtgatac taaaatgtat acacgtacag ctacaacaag tgatagtcaa	180
aaaaatatta ctcaaagctt acaatttaat ttcttaactg aacctaatga tgataaagaa	240
acagtattta ttaaagcaaa aggtacaatt ggtagtgggt tgagaatfff agaccctaat	300
ggttattgga atagtacatt aagatggcct ggatcttatt cagtttcaat tcaaaatggt	360
gatgacaaca acaatacaaa tgtgactgac tttgcaccaa aaaatcagga tgaatcaaga	420
gaagttaa atacgtatgg ttataaaaca ggtggagatt tttcgattaa tctgtggaggc	480
ttaactggaa atattacaaa agagagtaat tattcagaga cgattagtta tcaacaacca	540
tcatatcgta cattacttga tcaatctacg tcacataaag gtgtagggtg gaaagtagaa	600
gcacatttga taaataatat gggacatgac catacgagac aattaactaa tgatagtgat	660
aatagaacta aaagtgaaat tttttcttta acacgaaatg gaaatttatg ggcgaaagat	720
aatttcacac ctaaagacaa aatgcctgta actgtgtctg aagggtttaa tccagaattt	780
ttagctgtta tgtcacatga taaaaagac aaaggtaa cacaatttgt tgttcattat	840
aaaagatcaa tggatgagtt taaaatagat tggaatcgcc atggtttctg gggctattgg	900
tctggtgaaa accatgtaga taaaaagaa gaaaaattat cagcattata tgaagttgat	960
tggaagacac ataatgtgaa gtttgtaaaa gtacttaatg ataatgaaaa gaaataa	1017

<210> 30

10 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Sintético

<400> 30

cccgtcgact tatccttctt tataaggtt attgct 36

5 <210> 31

<211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cebador Sintético

<400> 31

cccgaaggat ttcacatcat catcatcatc acaattcagc tcataaagac tctc 54

<210> 32

<211> 58

15 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Sintético

<400> 32

20 ccccgaagga ttcacatca tcatcatcat cacaagatta attctgaaat caaacaag 58

<210> 33

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Cebador Sintético

<400> 33

cccgtcgact tatttctttt cattatcatt aagtactt 38

<210> 34

30 <211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Sintético
 <400> 34
 5 cccctcgag aattcagctc ataaagactc tcaag 35
 <210> 35
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Cebador Sintético
 <400> 35
 cccggatcc ttatccttct ttataaggtt tattgtc 37
 <210> 36
 15 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Sintético
 20 <400> 36
 cccggatcc ttaatatta tcaacgactt taactg 36
 <210> 37
 <211> 32
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador Sintético
 <400> 37
 cccctcgag tcaacagcac cggatgatat tg 32
 30 <210> 38
 <211> 35

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador Sintético
5 <400> 38
cccctcgag aagattaatt ctgaaatcaa acaag 35
<210> 39
<211> 40
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador Sintético
<400> 39
ccccgatcc ttattcttt tcattatcat taagtacttt 40
15 <210> 40
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
20 <223> Cebador Sintético
<400> 40
gggcatatga attcagctca taaagactct caa 33
<210> 41
<211> 33
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador Sintético
<400> 41
30 cccgtcgact cctctttat aaggtttatt gtc 33
<210> 42

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Cebador Sintético

<400> 42

gggcatatga agattaattc tgaatcaaa caag 34

<210> 43

<211> 35

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador Sintético

<400> 43

15 cccgtcgact ttctttcat taccattaag tactt 35

<210> 44

<211> 279

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

20 <220>

<221> CARACTERÍSTICA NUEVA

<222> (1)..(279)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 44

ES 2 605 476 T3

Xaa Asn Asn Ile Glu Asp Ile Gly Xaa Gly Ala Glu Ile Ile Lys Arg
1 5 10 15

Thr Glu Asp Val Xaa Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Ile Gln
20 25 30

Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val
35 40 45

Lys Met Gln Gly Phe Ile Xaa Ser Arg Thr Thr Tyr Xaa Xaa Tyr Lys
50 55 60

Lys Xaa Xaa His Ile Lys Xaa Met Xaa Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile

<400> 45

Glu Asn Lys Ile Glu Asp Ile Gly Gln Gly Ala Glu Ile Ile Lys Arg

ES 2 605 476 T3

Arg Asn Val Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu Val
260 265 270

Lys Ile Lys Ser Ile Thr Pro Lys
275 280

<210> 46

<211> 286

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 46

ES 2 605 476 T3

Ala Asn Asp Thr Glu Asp Ile Gly Lys Gly Ser Asp Ile Glu Ile Ile
 1 5 10 15

Lys Arg Thr Glu Asp Lys Thr Ser Asn Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn
 20 25 30

Ile Gln Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu
 35 40 45

Ile Leu Lys Met Gln Gly Phe Ile Ser Ser Arg Thr Thr Tyr Tyr Asn
 50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Asn His Val Lys Ala Met Arg Trp Pro Phe Gln Tyr
 65 70 75 80

Asn Ile Gly Leu Lys Thr Asn Asp Lys Tyr Val Ser Leu Ile Asn Tyr
 85 90 95

Leu Pro Lys Asn Lys Ile Glu Ser Thr Asn Val Ser Gln Thr Leu Gly
 100 105 110

Tyr Asn Ile Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Leu Gly Gly Asn
 115 120 125

Gly Ser Phe Asn Tyr Ser Lys Ser Ile Ser Tyr Thr Gln Gln Asn Tyr
 130 135 140

Val Ser Glu Val Glu Gln Gln Asn Ser Lys Ser Val Leu Trp Gly Val
 145 150 155 160

Lys Ala Asn Ser Phe Ala Thr Glu Ser Gly Gln Lys Ser Ala Phe Asp
 165 170 175

Ser Asp Leu Phe Val Gly Tyr Lys Pro His Ser Lys Asp Pro Arg Asp
 180 185 190

ES 2 605 476 T3

Tyr Phe Val Pro Asp Ser Glu Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe
195 200 205

Asn Pro Ser Phe Ile Ala Thr Val Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp
210 215 220

Thr Ser Glu Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn Met Asp Val Thr His
225 230 235 240

Ala Ile Lys Arg Ser Thr His Tyr Gly Asn Ser Tyr Leu Asp Gly His
245 250 255

Arg Val His Asn Ala Phe Val Asn Arg Asn Tyr Thr Val Lys Tyr Glu
260 265 270

Val Asn Trp Lys Thr His Glu Ile Lys Val Lys Gly Gln Asn
275 280 285

<210> 47

<211> 283

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 47

ES 2 605 476 T3

Asn Thr Asn Ile Glu Asn Ile Gly Asp Gly Ala Glu Val Ile Lys Arg
 1 5 10 15
 Thr Glu Asp Val Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln
 20 25 30
 Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val
 35 40 45
 Lys Met Gln Gly Phe Ile Asn Ser Arg Thr Ser Phe Ser Asp Val Lys
 50 55 60
 Gly Ser Gly Tyr Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr
 65 70 75 80
 Asn Ile Gly Leu Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr
 85 90 95
 Leu Pro Lys Asn Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly
 100 105 110
 Tyr Asn Ile Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn
 115 120 125

ES 2 605 476 T3

Gly Ser Phe Asn Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr
 130 135 140

Val Ser Glu Val Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Val Gly Val
 145 150 155 160

Lys Ala Asn Glu Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp
 165 170 175

Arg Tyr Leu Phe Val Gln Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Ser Ala Arg
 180 185 190

Glu Tyr Phe Ala Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly
 195 200 205

Glu Asn Pro Ser Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser
 210 215 220

Asp Thr Ser Glu Phe Glu Ile Ser Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Ile Thr
 225 230 235 240

Tyr Ala Thr Leu Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His
 245 250 255

Asn Ala Phe Val Asn Arg Asn Phe Val Val Arg Tyr Glu Val Asn Trp
 260 265 270

Lys Thr His Glu Ile Lys Val Lys Gly His Asn
 275 280

<210> 48

<211> 324

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 48

ES 2 605 476 T3

Gln Phe Asp Phe Ile Asp Asp Pro Thr Tyr Asp Lys Asn Val Leu Leu
65 70 75 80

Val Lys Lys Gln Gly Ser Ile His Ser Asn Leu Lys Phe Glu Ser His
85 90 95

Lys Glu Glu Lys Asn Ser Asn Trp Leu Lys Tyr Pro Ser Glu Tyr His
100 105 110

Val Asp Phe Gln Val Lys Arg Asn Arg Lys Thr Glu Ile Leu Asp Gln
115 120 125

Leu Pro Lys Asn Lys Ile Ser Thr Ala Lys Val Asp Ser Thr Phe Ser
130 135 140

Tyr Ser Ser Gly Gly Lys Phe Asp Ser Thr Lys Gly Ile Gly Arg Thr
145 150 155 160

Ser Ser Asn Ser Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr
165 170 175

Asp Thr Ile Ala Ser Gly Lys Asn Asn Asn Trp His Val His Trp Ser
180 185 190

Val Ile Ala Asn Asp Leu Lys Tyr Gly Gly Glu Val Lys Asn Arg Asn
195 200 205

Asp Glu Leu Leu Phe Tyr Arg Asn Thr Arg Ile Ala Thr Val Glu Asn
210 215 220

Pro Glu Leu Ser Phe Ala Ser Lys Tyr Arg Tyr Pro Ala Leu Val Arg
225 230 235 240

Ser Gly Glu Asn Pro Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Ser Asn Glu Lys Ser
245 250 255

Asn Glu Lys Thr Gln Phe Glu Val Thr Tyr Thr Arg Asn Gln Asp Ile
260 265 270

Leu Lys Asn Arg Pro Gly Ile His Tyr Ala Pro Pro Ile Leu Glu Lys
275 280 285

Asn Lys Asp Gly Gln Arg Leu Ile Val Thr Tyr Glu Val Asp Trp Lys
290 295 300

Asn Lys Thr Val Lys Val Val Asp Lys Tyr Ser Asp Asp Asn Lys Pro
305 310 315 320

Tyr Lys Glu Gly

<210> 49

<211> 284

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 49

ES 2 605 476 T3

Asp Asn Asn Ile Glu Asn Ile Gly Asp Gly Ala Glu Val Val Lys Arg
 1 5 10 15
 Thr Glu Asp Thr Ser Ser Asp Lys Val Gly Val Thr Gln Asn Ile Gln
 20 25 30
 Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Leu
 35 40 45
 Lys Met Gln Gly Phe Ile Asn Ser Lys Thr Thr Tyr Tyr Asn Tyr Lys
 50 55 60
 Asn Thr Asp His Ile Lys Ala Met Arg Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile
 65 70 75 80
 Gly Leu Lys Thr Asn Asp Pro Asn Val Asp Leu Ile Asn Tyr Leu Pro
 85 90 95
 Lys Asn Lys Ile Asp Ser Val Asn Val Ser Gln Thr Leu Gly Tyr Asn
 100 105 110
 Ile Gly Gly Asn Phe Asn Ser Gly Pro Ser Thr Gly Gly Asn Gly Ser
 115 120 125
 Phe Asn Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Ile Ser
 130 135 140
 Glu Val Glu Arg Gln Asn Ser Lys Ser Val Gln Trp Gly Ile Lys Ala
 145 150 155 160
 Asn Ser Phe Ile Thr Ser Leu Gly Lys Met Ser Gly His Asp Pro Asn
 165 170 175
 Leu Phe Val Gly Tyr Lys Pro Tyr Ser Gln Asn Pro Arg Asp Tyr Phe
 180 185 190
 Val Pro Asp Asn Glu Leu Pro Pro Leu Val His Ser Gly Phe Asn Pro
 195 200 205

ES 2 605 476 T3

Ser Phe Ile Ala Thr Val Ser His Glu Lys Gly Ser Gly Asp Thr Ser
210 215 220

Glu Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn Met Asp Val Thr His Ala Thr
225 230 235 240

Arg Arg Thr Thr His Tyr Gly Asn Ser Tyr Leu Glu Gly Ser Arg Ile
245 250 255

His Asn Ala Phe Val Asn Arg Asn Tyr Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn
260 265 270

Trp Lys Thr His Glu Ile Lys Val Lys Gly His Asn
275 280

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición que comprende un agente activo, comprendiendo dicho agente activo: a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido LukA que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-14, o una secuencia que tiene al menos 70% de similitud de secuencia con cualquier de las SEQ ID NOS: 1-14; y b) una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido LukB que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 15-27, o una secuencia que tiene al menos 70% de similitud de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 15-27, en donde dicho polipéptido LukA y/o polipéptido LukB está sustancialmente libre de otras proteínas y componentes celulares con los que LukA y LukB están asociados en su estado nativo.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde a) es un polipéptido LukA maduro.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1, en donde a) comprende un polipéptido LukA que carece de los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 342-351 de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-14.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde b) es un polipéptido LukB maduro.
- 15 5. La composición de la reivindicación 1 para su uso en un método para inhibir la aparición o el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus*, comprendiendo además dicha composición un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. La composición de la reivindicación 1 para su uso en un método para inhibir la aparición o el tratamiento de un estado inflamatorio agudo, comprendiendo dicho método administrar la composición a un sujeto mamífero que lo necesite.
7. La composición de la reivindicación 6, para su uso en un método para inhibir la aparición o el tratamiento de una afección inflamatoria aguda, en donde la afección inflamatoria aguda está localizada.
- 20 8. La composición de la reivindicación 6, para su uso en un método para inhibir la aparición o el tratamiento de una afección inflamatoria aguda, en donde la afección inflamatoria aguda es una herida infectada en la piel o tejido blando.
9. La composición de la reivindicación 5 para su uso en un método para inhibir la aparición o el tratamiento de una infección por *Staphylococcus aureus*, comprendiendo dicho método administrar la composición a un sujeto mamífero que lo necesite, en donde la infección por *S. aureus* es una infección por MRSA.
- 25 10. Un método para identificar inhibidores de la citotoxicidad mediada por LukAB, que comprende a) poner en contacto en un medio de reacción, fagocitos humanos y al menos una concentración de un compuesto de ensayo, seguido de LukA que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-14 o una secuencia que tiene al menos 70% de similitud de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-14 y LukB que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 15-27 o una secuencia que tiene al menos 70% de similitud de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 15-27, en condiciones que permitan la intoxicación de los fagocitos por LukA y LukB; b) poner en contacto los fagocitos de a) con una etiqueta detectable permeable a las células o impermeable a las células; y c) medir la cantidad de la etiqueta permeable incorporada por los fagocitos como una función de la viabilidad de los fagocitos de b), en donde un aumento en la cantidad de la etiqueta, con respecto a al menos un control, indica una mayor viabilidad celular y que el compuesto de ensayo inhibe la citotoxicidad mediada por LukAB, o c) medir el daño de las membranas de los fagocitos en función de la cantidad de etiqueta impermeable, en donde una disminución en la cantidad de la etiqueta, con respecto a al menos un control, indica que el compuesto de ensayo inhibe la citotoxicidad de LukAB.
- 30 11. Un método para identificar inhibidores de la unión de LukA a fagocitos humanos, que comprende a) poner en contacto en un medio de reacción fagocitos humanos y al menos una concentración de un compuesto de ensayo, seguido de LukA marcado en forma detectable que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-14 o una secuencia que tiene al menos 70% de similitud de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-14 en condiciones que permiten la unión de LukA a los fagocitos; y b) medir la cantidad de etiqueta en función de la unión de LukA a los fagocitos, en donde una disminución de la cantidad de la etiqueta, con respecto a al menos un control, indica que el compuesto de ensayo inhibe la unión de LukA a fagocitos humanos.
- 35 40 12. Un método para identificar inhibidores de la oligomerización de LukAB, que comprende: a) poner en contacto en un medio de reacción fagocitos humanos y al menos una concentración de un compuesto de ensayo, seguido de LukA que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 14 o una secuencia que tiene al menos 70% de similitud de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-14 y LukB marcado en forma detectable que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 15-27 o una secuencia que tiene al menos 70% de similitud de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 15-27 en condiciones que permitan la unión de LukA a los fagocitos y la oligomerización de LukA y LukB; y b) medir la cantidad de la etiqueta en función de la oligomerización de
- 45 50

LukA y LukB, en donde una disminución en la cantidad de la etiqueta, con respecto a al menos un control, indica que el compuesto de ensayo inhibe la oligomerización de LukA y LukB.

- 5 13. Un método para identificar inhibidores de la formación de poros de LukAB en membranas de fagocitos humanos, que comprende: a) poner en contacto en un medio de reacción fagocitos humanos y al menos una concentración de un compuesto de ensayo, seguido por LukA que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-14 o una secuencia que tiene al menos 70% de similitud de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-14 y LukB que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 15-27 o una secuencia que tiene al menos 70% de similitud de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 15-27 en condiciones que permitan la intoxicación de los fagocitos por LukA y LukB; b) la unión de LukA a los fagocitos y oligomerización de LukA y LukB; poner en contacto los fagocitos de a) con una etiqueta detectable a la cual los fagocitos no intoxicados son impermeables; y c) medir la cantidad de la etiqueta incorporada por los fagocitos en función de la extensión de la formación de poros mediada por LukAB en las membranas de los fagocitos, en donde una disminución en la cantidad de la etiqueta, con respecto a al menos un control, indica que el compuesto de ensayo inhibe la formación de poros de LukAB en las membranas de los fagocitos humanos.
- 10
- 15 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 - 13, en donde el marcador detectable es un colorante fluorescente.
15. El método de la reivindicación 13, en donde el marcador detectable es bromuro de etidio.
- 20 16. Un método para predecir la gravedad de una infección causada por S. Aureus, que comprende: a) el cultivo de S. aureus obtenido de un sujeto infectado a través de una muestra de fluido o tejido del sujeto; y b) extraer y cuantificar LukA que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-14 o una secuencia que tiene al menos 70% de similitud de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-14 y/o LukB que tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 15-27 o una secuencia que tiene al menos 70% de similitud de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS: 15-27 de S. aureus cultivado; en donde la detección de la presencia o cantidades relativamente altas de LukA y/o LukB de b) con respecto a un control que produce cantidades pequeñas o indetectables de LukA y/o LukB, es indicativa de una infección grave en el sujeto.
- 25

FIG. 2-1

Mayoría	MIKQCKNITICSLALSTALTVFPATSYAKINSEIKOVSEKNLDGDKMYTRATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE	10	20	30	40	50	60	70	80
A9635.pro	MIKQCKNITICSLALSTALTVFPASSYAEIKSKITTVSEKNLDGDKMYTRATTSDTEKKISQSLQFNFLTEPNYDKE								80
COL.pro	-----MYTRATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE								32
D139.pro	MIKQCKNITICSLALSTALTVFPASSYAKINSEIKOVSEKNLDGDKMYTRATTSDSQKNITQSLQFNFLTEKNYDKE								80
E1410.pro	MIKQCKNITICSLALSTALTVFPASSYAEIKSKITTVSEKNLDGDKMYTRATTSDTEKKISQSLQFNFLTEPNYDKE								80
JKD6008.pro	MIKQCKNITICTLALSTFTFVL PATSF AKINSEIKOVSEKNLDGDKMYTRATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE								80
MRS A252.pro	MIKQCKNITICSLALSTALTVFPASSYAEIKSKITTVSEKNLDGDKMYTRATTSDTEKKISQSLQFNFLTEPNYDKE								80
Mu50.pro	MIKQLYKNITICSLALSTALTVFPATSYAKINSEIKAVSEKNLDGDKMYTRATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE								80
MW2.pro	MIKQLYKNITICTLALSTFTFVL PATSYAKINSEIKAVSEKNLDGDKMYTRATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE								80
RF122.pro	MIKQLYKNITICSLTALTVFPATSYAKINSEIKAVSEKNLDGDKMYTRATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE								80
TCH130.pro	MIKQCKNITICTLALSTFTFVL PATSF AKINSEIKOVSEKNLDGDKMYTRATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE								80
USA300_FPR3757.pro	MIKQCKNITICTLALSTFTFVL PATSF AKINSEIKOVSEKNLDGDKMYTRATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE								80
Newman (LukB).pro	MIKQCKNITICTLALSTFTFVL PATSF AKINSEIKOVSEKNLDGDKMYTRATTSDSQKNITQSLQFNFLTEPNYDKE								80

FIG. 2-5

Mayoria	DWKTHTNVKFKVVLNDNEKK	
	-----+-----	
	330	
	-----+-----	
A9635.pro	DWKTHTDVKLLIKTFNDKEKK	339
COL.pro	DWKTHTNVKFKVVLNDNEKK	290
D139.pro	DWKTHTNVKFKVVLNDNEKK	338
E1410.pro	DWKTHTDVKLLIKTINDKEQK	339
JKD6008.pro	DWKTHTNVKFKVVLNDNEKK	338
MRS4252.pro	DWKTHTDVKLLIKTINDKEQK	339
Mu50.pro	DWKTHTDVKFKVVLNDNEKK	338
MW2.pro	DWKTHTNVKFKVVLNDNEKK	338
RF122.pro	DWKTHTDVKFKVVLNDNEKK	338
TCH130.pro	DWKTHTNVKFKVVLNDNEKK	338
USA300_FPR3757.pro	DWKTHTNVKFKVVLNDNEKK	338
Newman (LukB).pro	DWKTHTNVKFKVVLNDNEKK	

FIG. 3

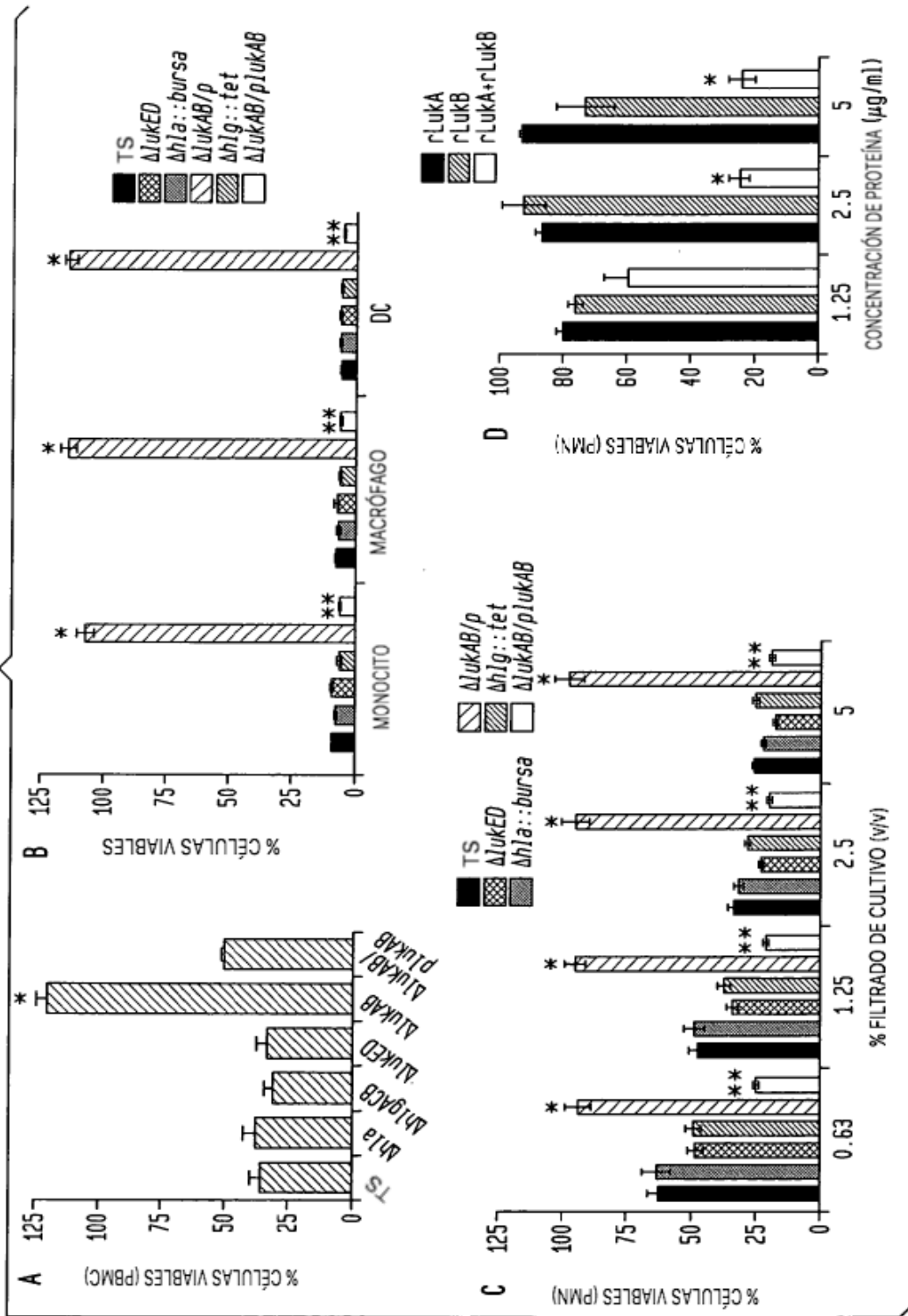


FIG. 4

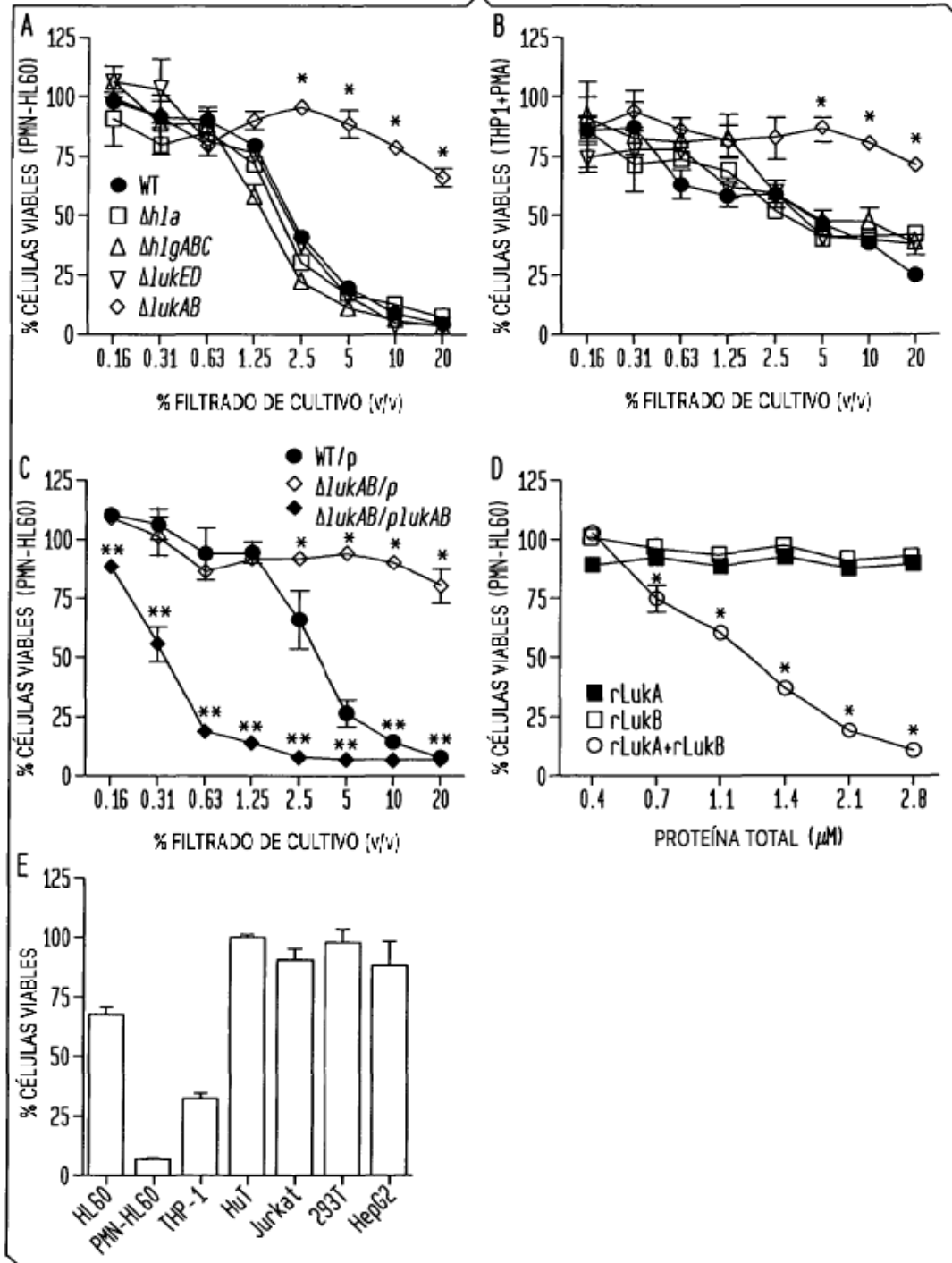


FIG. 5

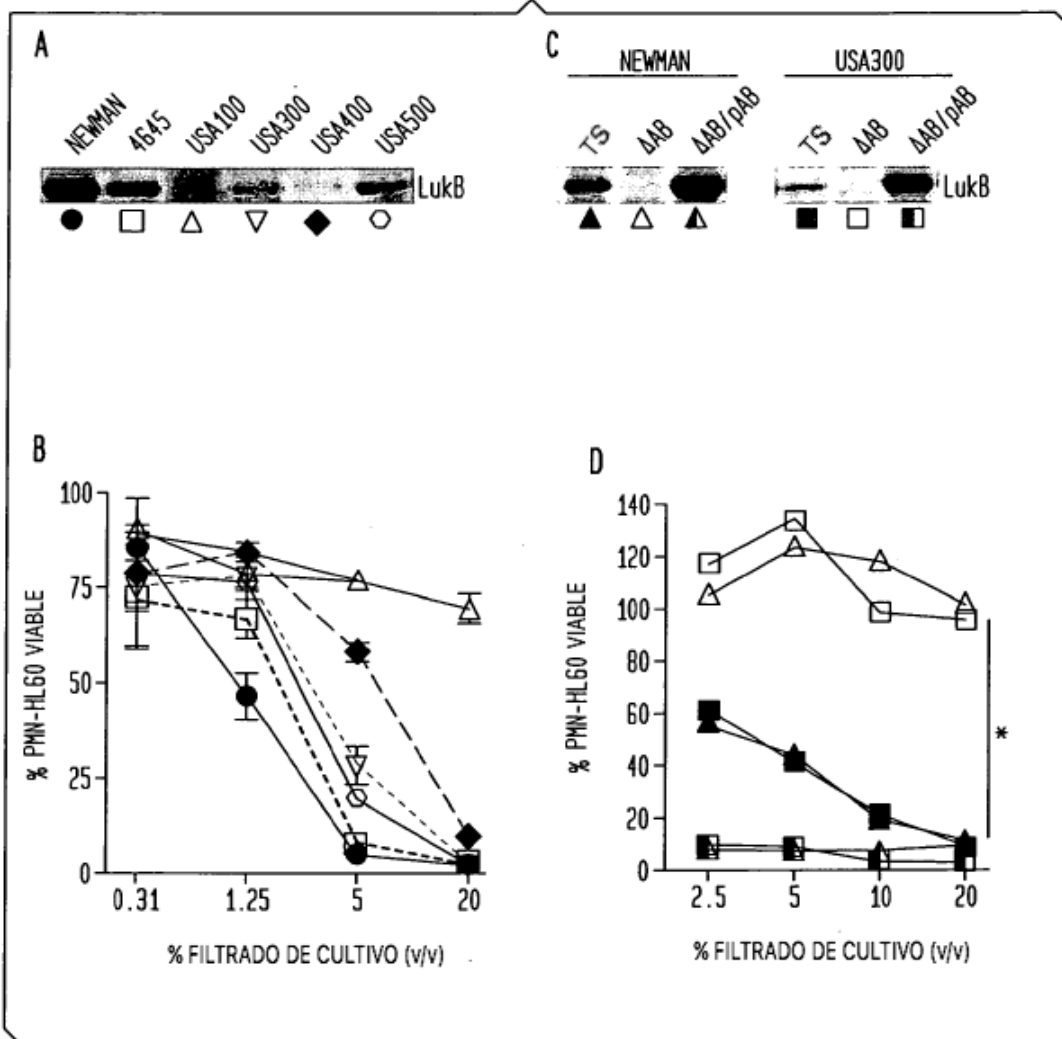


FIG. 6

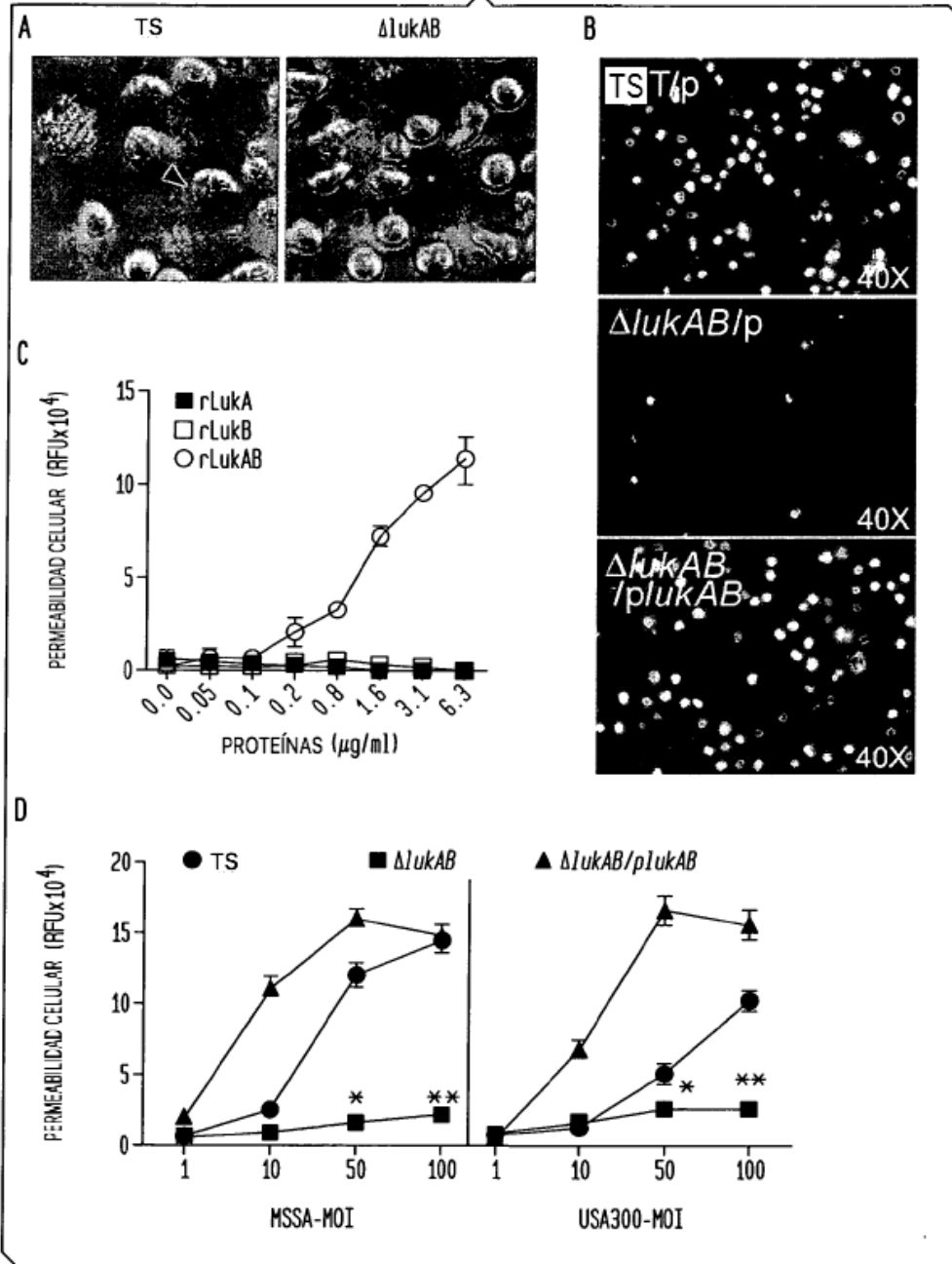


FIG. 7

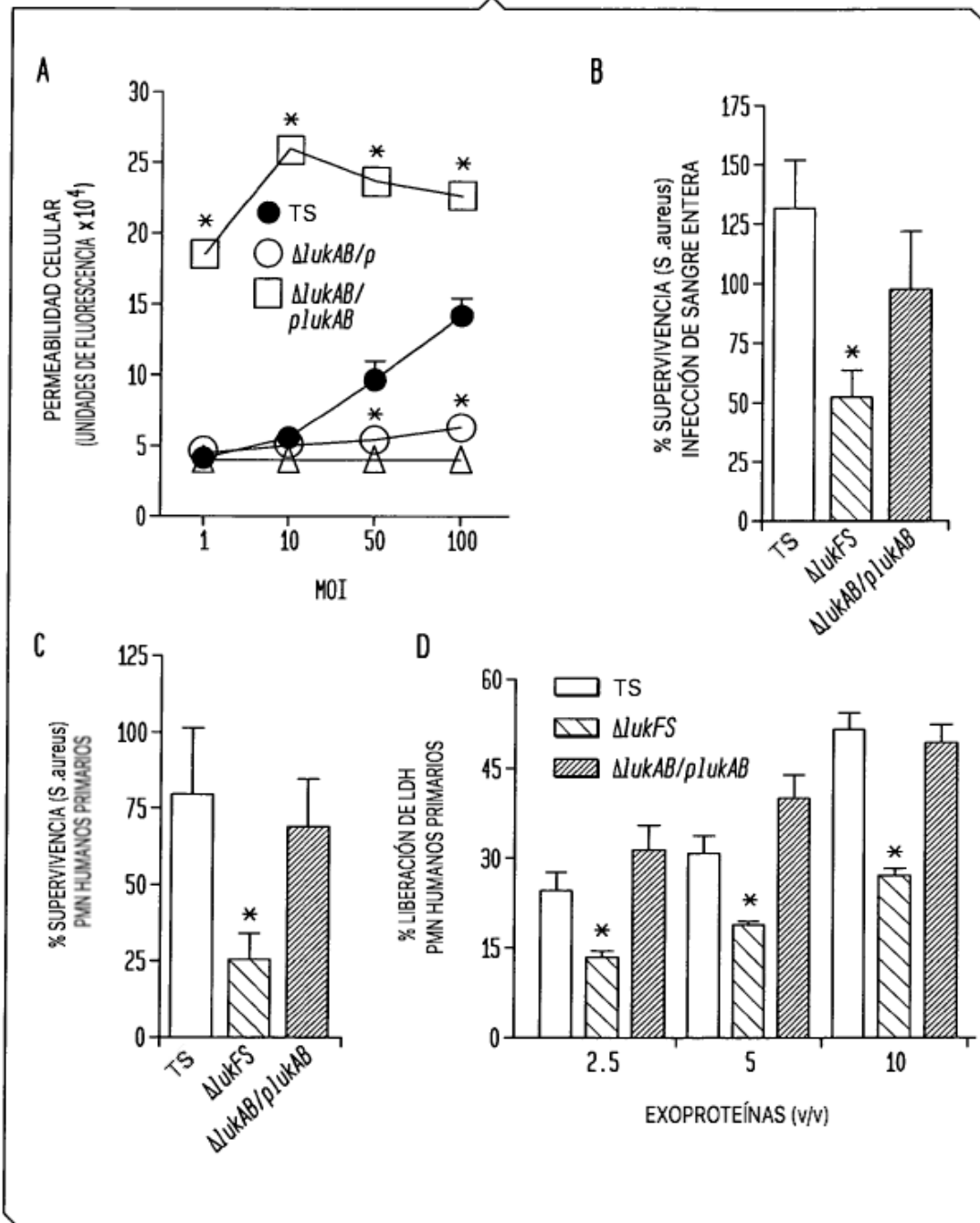


FIG. 8

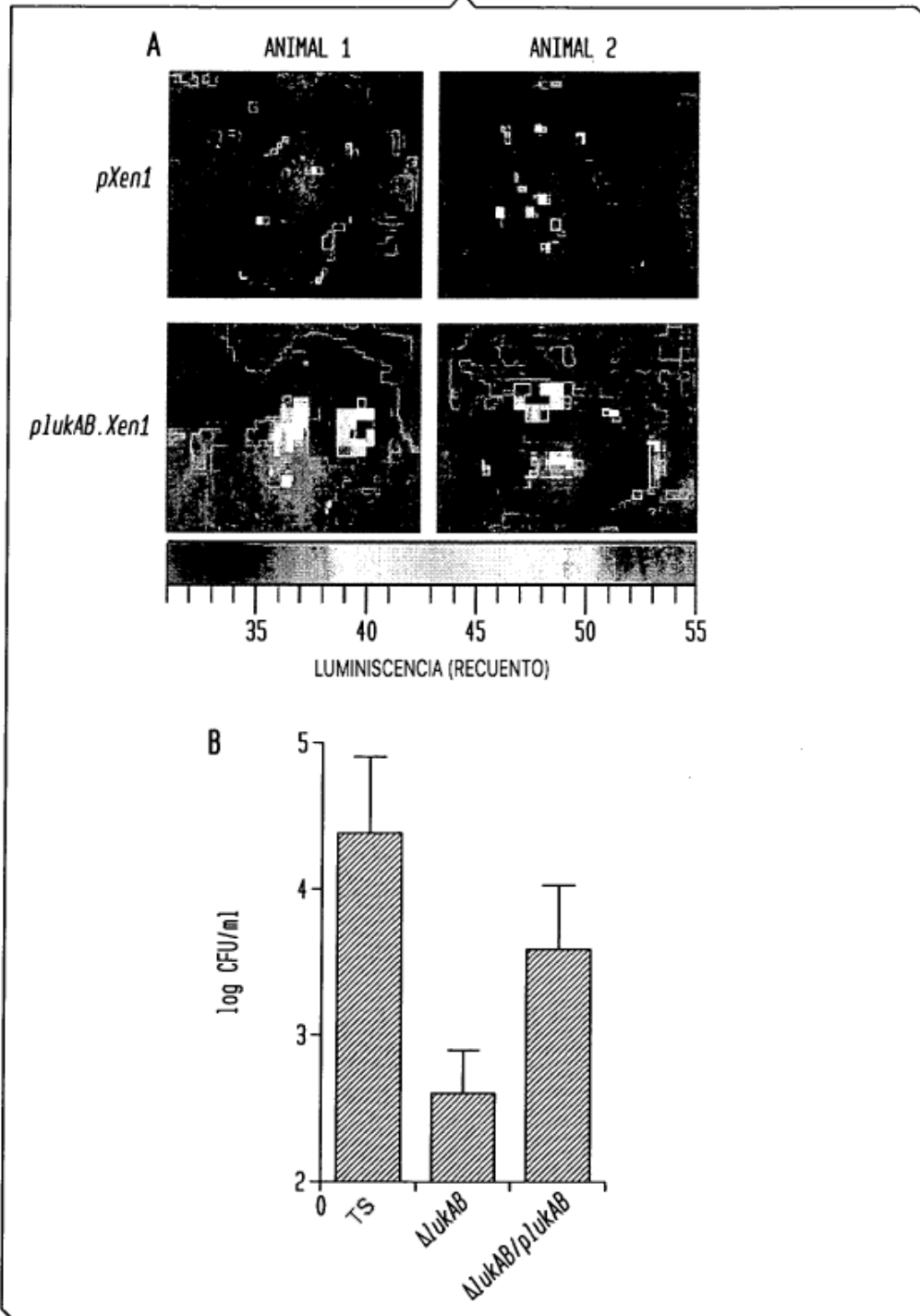


FIG. 9

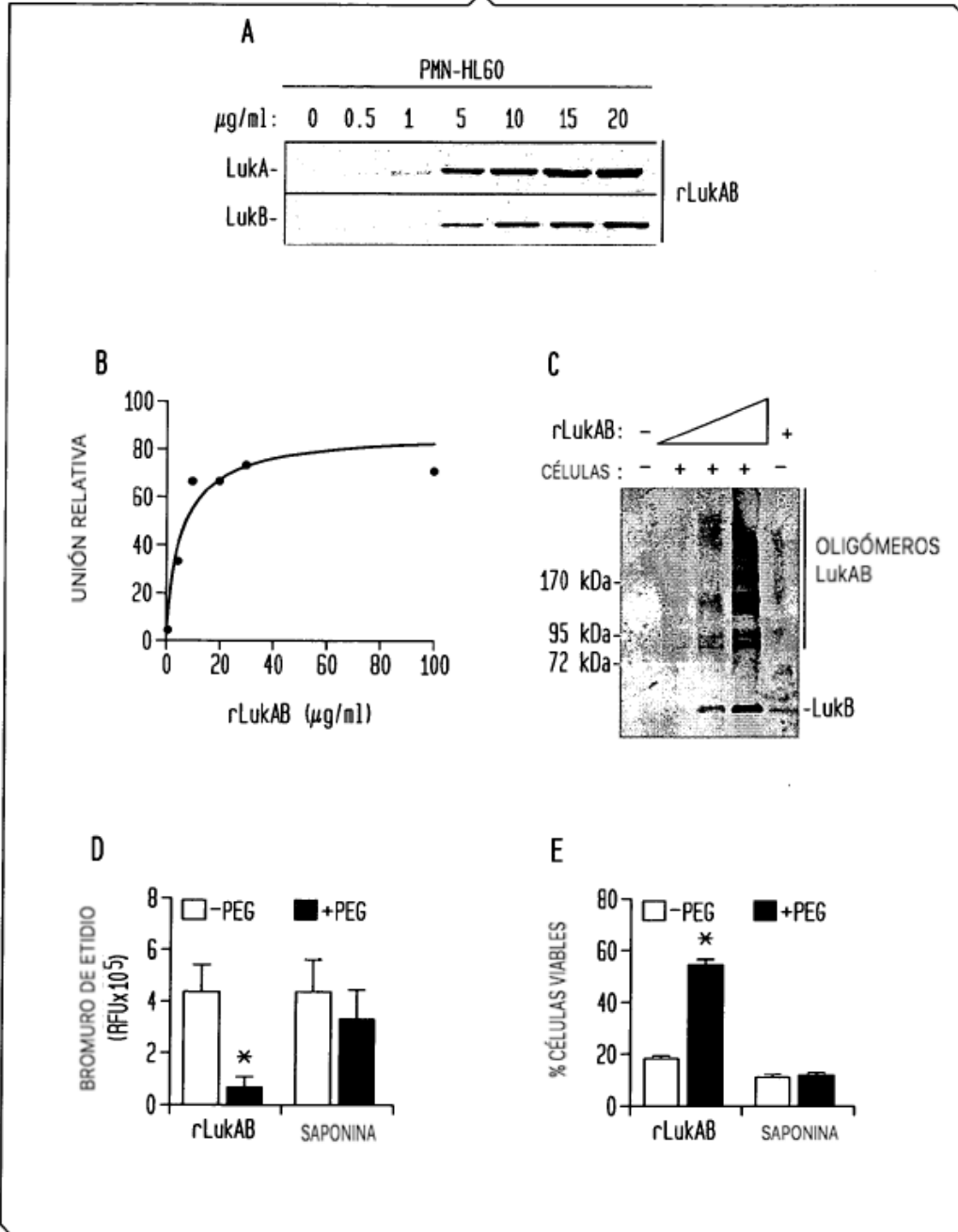


FIG. 10

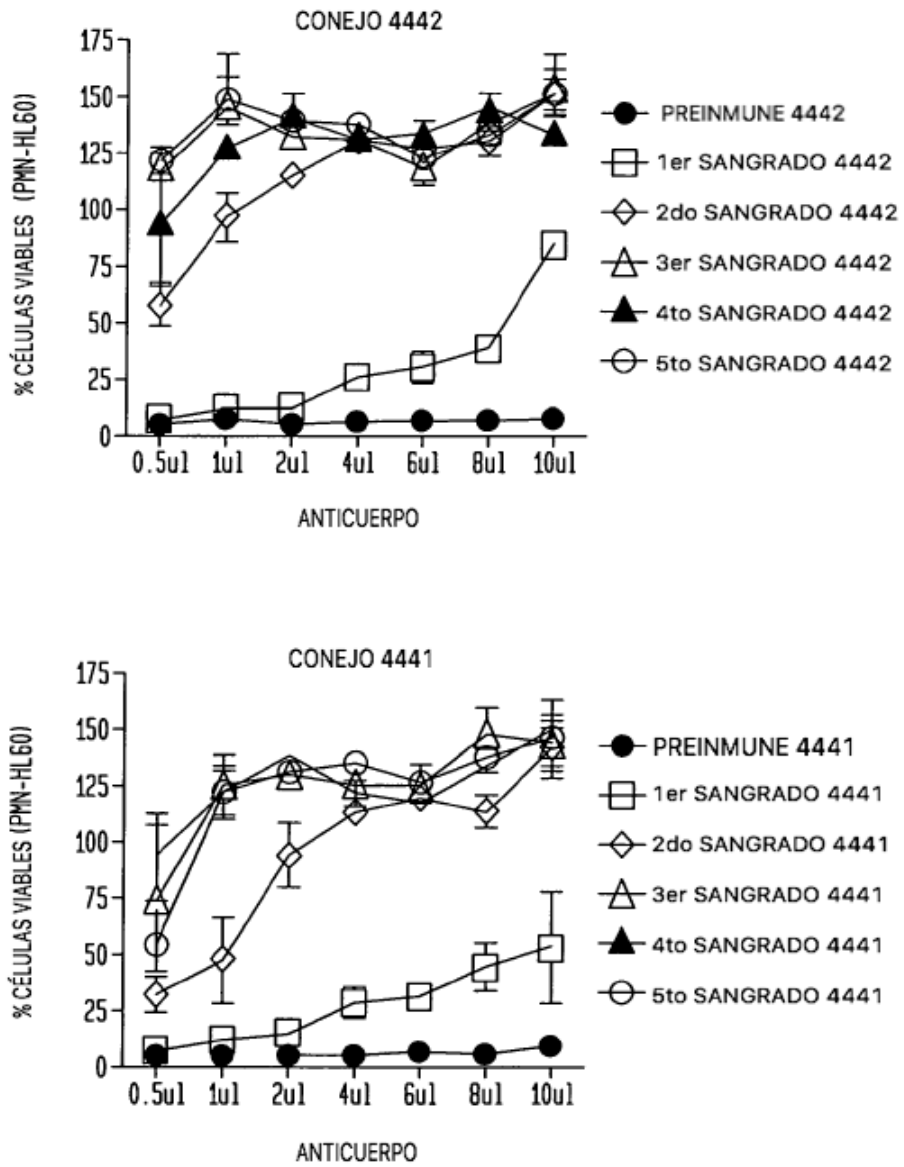


FIG. 11A-1

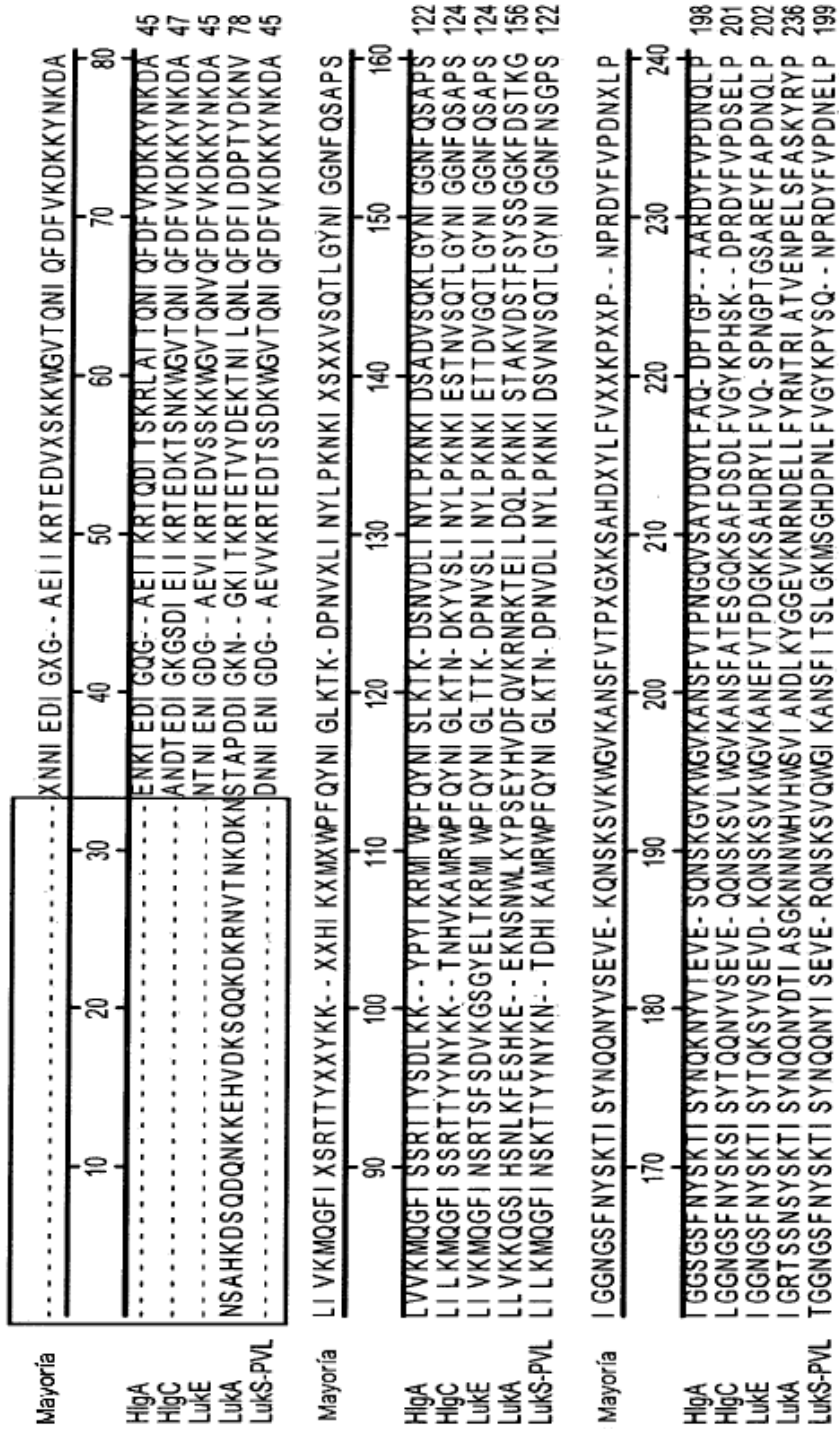


FIG. 11A-2



FIG. 11B

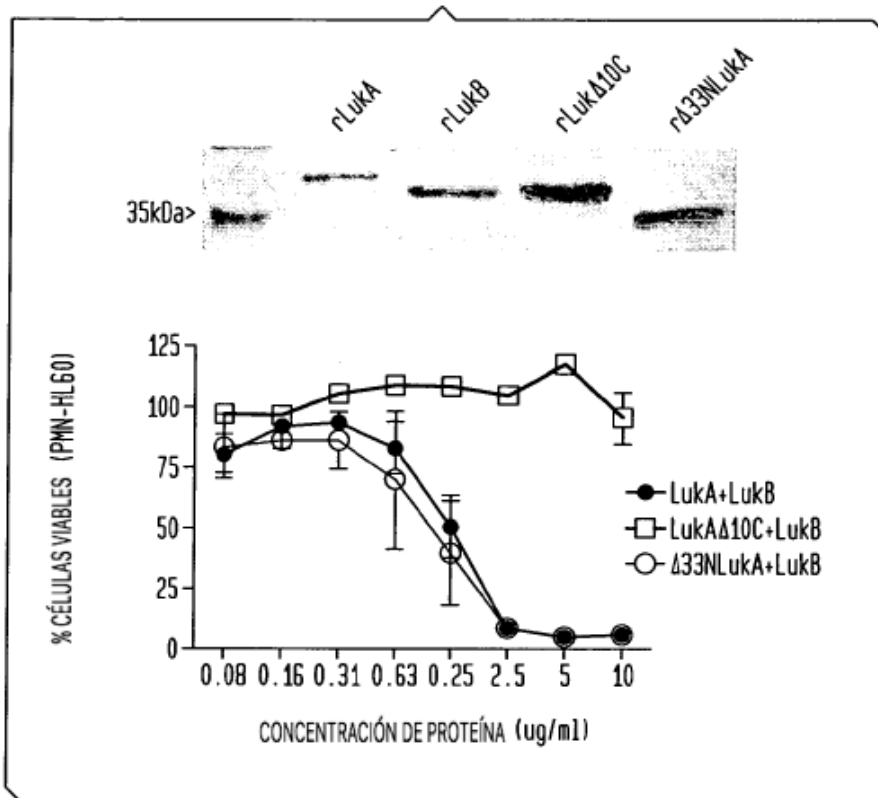


FIG. 11C

