

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 088**

51 Int. Cl.:

A61K 39/085 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2012 PCT/US2012/043179**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12177658**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2012 E 12801920 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2720714**

54 Título: **Métodos de tratamiento y prevención de infecciones por staphylococcus aureus y afecciones asociadas**

30 Prioridad:

19.06.2011 US 201161498596 P

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

01.10.2018

73 Titular/es:

**NEW YORK UNIVERSITY (100.0%)
70 Washington Square South
New York, NY 10012-1091, US**

72 Inventor/es:

**TORRES, VICTOR, J. y
ALONZO, FRANCIS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 684 088 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

Métodos de tratamiento y prevención de infecciones por *Staphylococcus aureus* y afecciones asociadas

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a métodos de cribado para, tratar y prevenir infecciones por *Staphylococcus aureus* y afecciones asociadas a *Staphylococcus aureus*.

Antecedentes de la invención

10 El *Staphylococcus aureus* ('*S. aureus*_') es una bacteria que coloniza de manera comensal más del 25% de la población humana. Es importante destacar que este organismo es capaz de romper su sitio inicial de colonización, lo que resulta en la diseminación bacteriana y la enfermedad. *S. aureus* es la principal causa de infecciones nosocomiales, es el agente etiológico más común de la endocarditis infecciosa, así como de las infecciones de la piel y los tejidos blandos, y es una de las cuatro causas principales de enfermedades transmitidas por los alimentos. En total, *S. aureus* infecta a más de 1.2 millones de pacientes por año en los hospitales de EE. UU. La amenaza de *S. aureus* para la salud humana se destaca aún más por la aparición de cepas resistentes a antibióticos (esto es, cepas resistentes a meticilina de *S. aureus* (MRSA)), incluidas las cepas resistentes a la vancomicina, un antibiótico considerado la última línea de defensa contra la infección por *S. aureus*. Estos hechos resaltan la importancia de desarrollar nuevas terapias contra este importante patógeno.

20 El *S. aureus* produce una diversa gama de factores de virulencia y toxinas que permiten a esta bacteria neutralizar y resistir el ataque de diferentes tipos de células inmunes, específicamente subpoblaciones de glóbulos blancos que forman 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, 'Understanding How Leading Bacterial Pathogens Subvert Innate Immunity to Reveal Novel Therapeutic Targets,' *J. Allergy Clin. Immunol.* 120(1):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 Menestrina et al., 'Mode of Action of Beta-Barrel Pore-Forming Toxins of the Staphylococcal Alpha-Hemolysin Family,' *Toxicol.* 39(11):1661-1672 (2001)). Entre estas leucotoxinas de dos componentes, la gamma-hemolisina (HlgAB y HlgCB) y la leucocidina Pantone-Valentine (PVL) son las mejor caracterizadas.

30 La toxicidad de las leucocidinas hacia las células de mamífero implica la acción de dos componentes o subunidades. La primera subunidad se denomina subunidad de clase S (esto es, "eluida lentamente_"), y la segunda subunidad se denomina subunidad de clase F (esto es, "eluida rápidamente_"). Las subunidades S y F actúan sinérgicamente para formar poros en los glóbulos blancos, incluidos monocitos, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos (conocidos colectivamente como fagocitos) (véase Menestrina et al., "Mode of Action of Beta-Barrel Pore-Forming Toxins of the Staphylococcal Alpha-Hemolysin Family," *Toxicol.* 39(11):1661-1672 (2001)). El mecanismo por el cual las toxinas de dos componentes forman poros en las membranas celulares diana no se entiende completamente. El mecanismo de acción propuesto de estas toxinas implica la unión de la subunidad S a la membrana celular diana, muy probablemente a través de un receptor, seguido de la unión de la subunidad F a la subunidad S, formando así un oligómero que a su vez forma un prepore que se inserta en la membrana celular diana (Jayasinghe et al., 'The de la leucocidina Pore: Evidence for an Octamer With Four LukF Subunits and Four LukS Subunits Alternating Around a Central Axis,' *Protein. Sci.* 14(10):2550-2561 (2005)). Los poros formados por las leucotoxinas de dos componentes son por lo general selectivos de cationes. La formación de poros causa la muerte celular a través de la lisis, que en los casos de los glóbulos blancos diana, se ha informado que es el resultado de un desequilibrio osmótico debido a la influxo de cationes (Miles et al., 'The Staphylococcal de la leucocidina Bicomponent Toxin Forms Large Ionic Channels,' *Biochemistry* 40(29):8514-8522 (2001)).

45 Además de PVL (también conocida como leukocidin 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 ('LukE/D_'), leucocidina A/B ('LukAB_') y leucocidina M/F ('LukMF_'). De este modo, las subunidades de clase S de estas leucocidinas de dos componentes incluyen HlgA, HlgC, LukE, LukS-PV, LukA y LukM, y las subunidades de clase F incluyen HlgB, LukD, LukF-PV, LukB y LukF'-PV. Las subunidades S y F de *S. aureus* no son específicas de leucocidina. Es decir, son intercambiables de forma tal que otras combinaciones de dos componentes podrían hacer un poro funcional en un glóbulo blanco, aumentando enormemente el repertorio de leucotoxinas (Meyer et al., 'Analysis of the Specificity of Pantone-Valentine Leucocidin and Gamma-Hemolysin F Component Binding,' *Infect. Immun.* 77(1):266-273 (2009)).

55 Diseñar una terapia eficaz para tratar la infección por MRSA ha sido especialmente desafiante. Además de la resistencia a la meticilina y los antibióticos relacionados, también se ha encontrado que el MRSA tiene niveles significativos de resistencia a los macrólidos (por ejemplo, eritromicina), combinaciones de inhibidores de la betalactamasa (por ejemplo, Unasyn, Augmentin) y fluoroquinolonas (por ejemplo, ciprofloxacina). así como a clindamicina, trimetoprim/sulfametoxisol (Bactrim) y rifampina. En el caso de infección grave por *S. aureus*, los médicos han recurrido

a la vancomicina intravenosa. Sin embargo, ha habido informes de resistencia de *S. aureus* a la vancomicina. De este modo, existe la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos que combaten eficazmente la infección por *S. aureus*.

La presente invención está dirigida a superar estas y otras limitaciones en la técnica.

Resumen de la invención

5 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de (i) un polipéptido de leucocidina E aislado (LukE) que tiene una longitud de 200-300 aminoácidos y comprende la secuencia de aminoácidos de residuos de aminoácidos 48-291 de SEQ ID NO: 11, (ii) un polipéptido de leucocidina D aislado (LukD) que tiene una longitud de 250-300 aminoácidos y comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 46-307 de la SEQ ID NO:22, o (iii) una combinación de los mismos, y un portador farmacéuticamente aceptable.

También se describe un método para inmunizar contra una infección por *Staphylococcus aureus* en un sujeto. Este método implica administrar una composición de la presente invención en una cantidad eficaz para inmunizar contra la infección por *S. aureus* en el sujeto.

15 También se describe una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo LukE, un anticuerpo LukD, o una combinación de los mismos, y un portador farmacéuticamente aceptable.

También se describe un método para prevenir una infección por *S. aureus* y/o afecciones asociadas con *S. aureus* en un sujeto. Este método implica administrar una composición que comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo LukE, un anticuerpo LukD, o una combinación de los mismos, en una cantidad eficaz para prevenir la infección por *S. aureus* y/o la condición asociada a *S. aureus* en el sujeto.

También se describe un método de tratamiento de una infección por *S. aureus* y/o afecciones asociadas con *S. aureus* en un sujeto. Este método implica la administración de una composición que comprende uno o más inhibidores de la citotoxicidad mediada por LukE/D en una cantidad eficaz para tratar la infección por *S. aureus* y/o la afección asociada a *S. aureus* en el sujeto.

25 También se describe un método para predecir la gravedad de una infección por *S. aureus*. Este método implica cultivar *S. aureus* obtenido de un sujeto infectado a través de una muestra de fluido o tejido del sujeto y cuantificar la expresión de LukE y/o LukD en *S. aureus* cultivado. Las cantidades cuantificadas de LukE y/o LukD en la muestra del sujeto se comparan con la cantidad de LukE y/o LukD en una muestra de control que produce cantidades pequeñas o indetectables de LukE y/o LukD y la gravedad de la infección por *S. aureus* se predice en base a dicha comparación.

30 También se describe un método de tratamiento de un sujeto con una infección por *S. aureus*. Este método implica cultivar *S. aureus* obtenido de un sujeto infectado a través de una muestra de fluido o tejido del sujeto y cuantificar la expresión de LukE y/o LukD en *S. aureus* cultivado. Las cantidades cuantificadas de LukE y/o LukD en la muestra del sujeto se comparan con la cantidad de LukE y/o LukD en una muestra control que produce cantidades pequeñas o indetectables de LukE y/o LukD y un tratamiento apropiado para el sujeto es determinado en base a esta comparación.

35 El método implica además administrar el tratamiento apropiado determinado al sujeto para tratar la infección por *S. aureus*.

También se describe un método para identificar inhibidores de citotoxicidad de LukE/D. Este método implica proporcionar una población celular, una preparación que contenga LukE/D y un inhibidor de LukE/D candidato. La población celular se expone a la preparación que contiene LukE/D en presencia y ausencia del inhibidor candidato, y la citotoxicidad mediada por LukE/D se mide en presencia y en ausencia del inhibidor candidato. Se compara la cantidad medida de citotoxicidad en presencia y en ausencia del inhibidor candidato y se identifica un inhibidor de la citotoxicidad de LukE/D en base a esa comparación.

También se describe un método para identificar inhibidores de la formación de poros mediada por LukE/D. Este método implica proporcionar una población de leucocitos, una preparación que contiene LukE y LukD, y un inhibidor candidato.

45 La población de leucocitos se expone a la preparación que contiene LukE y LukD en presencia y ausencia del inhibidor candidato, y la formación de poros en la población de leucocitos se mide en presencia y en ausencia del inhibidor candidato. Se compara la cantidad medida de formación de poros en presencia y en ausencia del inhibidor candidato, y se identifica un inhibidor de la formación de poros mediada por LukE/D en base a esa comparación.

También se describe un método para identificar inhibidores de la unión de leucocitos LukE y/o LukD. Este método implica proporcionar una población de leucocitos, una preparación que contiene un LukE y LukD marcados detectablemente, y un inhibidor candidato. La población celular se expone a la preparación que contiene los LukE y LukD marcados detectablemente en presencia y ausencia del inhibidor candidato, y la unión de LukE y/o LukD marcados a la población de leucocitos se mide en presencia y en ausencia del inhibidor candidato. Se compara la

cantidad medida de unión de leucocitos LukE y/o LukD en presencia y en ausencia del inhibidor candidato y se identifica un inhibidor de la unión de leucocitos LukE y/o LukD basándose en esa comparación.

El tremendo éxito de *S. aureus* como patógeno se debe en parte a su capacidad para expresar un arsenal de factores que dañan al huésped. Entre estos factores se encuentran un número de toxinas proteicas bacterianas que se secretan en el medio extracelular donde actúan eliminando las células del huésped. de la leucocidina E/D (LukE/D) es una toxina poco caracterizada producida por *S. aureus*. Como se demuestra en este documento, esta toxina se dirige y mata a los leucocitos del huésped, que son células inmunes clave implicadas en la protección del huésped de la infección por *S. aureus*. El descubrimiento de que LukE/D es crítico para la patogénesis in vivo, destaca la importancia de esta toxina en el procedimiento de la enfermedad. Como se describe en este documento, la inmunización con LukE y/o LukD genera anticuerpos neutralizantes contra *S. aureus*. Por lo tanto, las estrategias de vacuna activa y/o pasiva ofrecen una nueva estrategia terapéutica para prevenir la infección por *S. aureus*. Además, la inhibición directa de la citotoxicidad mediada por LukE/D ofrece un novedoso medio para tratar individuos con infección por *S. aureus*.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1B muestran que la eliminación del gen *rot* en un *S. aureus* que carece del locus *agr* ($\forall agr \forall rot$) restaura la virulencia en ratones a niveles de tipo salvaje ("WT") y conduce a la sobreproducción de LukE/D. La figura 1A es una curva de supervivencia que muestra que un doble mutante $\Delta agr \Delta rot$ muestra las características de virulencia de WT en ratones. La supervivencia de los ratones se controló después de la inyección intravenosa con $\sim 1 \times 10^7$ CFU de mutantes dobles Δagr o $\Delta agr \Delta rot$ de *S. aureus*. El número total de ratones por grupo fue N=6. La significación estadística entre curvas se determinó usando la prueba Log-rank (Mantel-Cox). ***, $p \leq 0.0005$. En la figura 1B, la producción de leucotoxinas se restablece en un mutante doble de $\Delta agr \Delta rot$. Se muestran inmunotransferencias de muestras de proteínas de sobrenadantes de cultivo bacteriano precipitados con TCA (cultivados durante 5 horas en RPMI+CAS) de las siguientes cepas: WT, Δagr y $\Delta agr \Delta rot$. Los carriles de control negativo contienen sobrenadante precipitado con TCA de los mutantes de supresión de leucotoxina respectivos ($\Delta lukE/D$, $\Delta lukA/B$, Δhla , $\Delta hlgC$). Las exoproteínas mutantes dobles de $\Delta lugE/D$ $\Delta hlgACB$ también se probaron en todas las inmunotransferencias LukE como control de la reactividad cruzada del anticuerpo LukE.

Las figuras 2A-2C ilustran que la delección de *rot* solo da como resultado la hipervirulencia en animales, un fenotipo causado por la desrepresión y la sobreproducción resultante de LukE/D. La curva de supervivencia de la figura 2A muestra la hipervirulencia de un mutante Δrot en comparación con la cepa WT original. La supervivencia de los ratones se controló después de la inyección intravenosa con $\sim 1 \times 10^7$ CFU de cepas de *S. aureus* WT y Δrot . Número total de ratones por grupo: WT, N=17; Δrot , N=12. La producción de LukE/D se incrementa en ausencia del represor transcripcional Rot, mientras que la producción de otras leucotoxinas no se ve afectada en gran medida. En las inmunotransferencias de la figura 2B se muestran muestras de proteínas de sobrenadantes de cultivos bacterianos precipitados con TCA (cultivados durante 5 horas en RPMI+CAS) de las siguientes cepas: WT y Δrot . Los carriles de control negativos contienen sobrenadante precipitado de TCA de respectivos mutantes dobles de toxina-rot ($\Delta rot \Delta lukE/D$, $\Delta rot \Delta lukA/B$, $\Delta rot \Delta hla$, y $\Delta rot \Delta hlgACB$). Las exoproteínas mutantes triples $\Delta rot \Delta lukE/D \Delta hlgACB$ también se probaron en todas las inmunotransferencias LukE como un control para la reactividad cruzada del anticuerpo LukE. Como se indica mediante la curva de supervivencia de la figura 2C, la hipervirulencia de un mutante Δrot se debe a una producción aumentada de LukE/D. La supervivencia de los ratones se controló después de la inyección intravenosa con $\sim 1 \times 10^7$ CFU de WT, Δrot , y $\Delta rot \Delta lukE/D$ de *S. aureus*. La significación estadística entre las curvas de supervivencia se determinó usando la prueba de Log-rank (Mantel-Cox). **, $p \leq 0.005$; ***, $p \leq 0.0005$.

Las figuras 3A-3B muestran que Rot se une al promotor *lukE/D* y reprime la expresión génica. Como se muestra en la figura 3A, la expresión óptima del gen *lukE/D* depende de la desrepresión de Rot. Las fusiones transcripcionales de la región promotora *lukE/D* a GFP se usaron para medir la activación del promotor en cultivo en caldo en los siguientes fondos de cepas (WT, Δagr , Δrot y $\Delta agr \Delta rot$). La fluorescencia de GFP se midió a lo largo del tiempo y los valores se expresaron como unidades fluorescentes relativas (RFU) después de la normalización a la densidad óptica bacteriana a 600 nm. Los valores mostrados son resultados de tres experimentos realizados por triplicado. En la figura 3B, Rot se une al promotor *lukE/D*. La figura 3B es una inmunotransferencia de un desplazamiento del promotor de ya sea ADN intragénico biotinilado (no específico) o ADN promotor de *lukE/D* unido a perlas magnéticas de estreptavidina M280 y se incubó con lisados de células enteras de *S. aureus*. Rot se detectó mediante inmunotransferencia usando un anticuerpo anti-Rot.

Las figuras 4A-4F ilustran que un único mutante $\Delta lukE/D$ está significativamente atenuado por la virulencia en un modelo de ratón de infección sistémica. Las figuras 4A y 4B muestran la verificación de la delección *lukE/D* en *S. aureus* Newman. En la figura 4A, se muestra la PCR del ADN genómico de *S. aureus* con cebadores específicos *lukE*. En la figura 4B se muestran inmunotransferencias de muestras de proteínas procedentes de sobrenadantes de cultivos bacterianos precipitados con TCA (cultivados durante 5 horas en RPMI+CAS) de las siguientes cepas: WT, $\Delta lukE/D$, $\Delta lukE/D::plukE/D$, $\Delta hlgACB$, y $\Delta hlgACB$. Las exoproteínas mutantes de $\Delta lukE/D$ también se probaron como un control para la reactividad cruzada del anticuerpo LukE. Las figuras 4C-4F muestran que el mutante $\Delta lukE/D$ está gravemente comprometido para la virulencia en ratones. En las figuras 4C y 4D, la supervivencia de los ratones se controló después de la inyección intravenosa con $\sim 1 \times 10^7$ CFU (Figura 4C) o $\sim 1 \times 10^8$ CFU (Figura 4D) de cepas WT, $\Delta lukE/D$, y $\Delta lukE/D::plukE/D$ de *S. aureus*. El número total de ratones por grupo fue N=6. La significancia estadística entre las

curvas de supervivencia se determinó usando la prueba Log-rank (Mantel-Cox). **, $p \leq 0.005$; ***, $p \leq 0.0005$. Las figuras 4E y 4F representan la enumeración de CFU bacterianas (Figura 4E) y patología macroscópica (Figura 4F) de riñones 96 horas después de la infección con $\sim 1 \times 10^7$ CFU de las mismas cepas descritas para las figuras 4C y 4D. Las flechas indican ubicaciones de abscesos renales. La significación estadística se determinó usando ANOVA de 1 vía con comparaciones múltiples de Tukey después de la prueba. **, $p \leq 0.005$; ***, $p \leq 0.0005$.

Las figuras 5A-5E muestran que Luke/D es tóxico para los poros y forma poros en las células inmunes humanas. La figura 5A es una curva de viabilidad celular que muestra que Luke/D recombinante purificado es tóxico para la línea celular similar a monocitos humanos THP-1. La línea celular THP-1 estaba intoxicada con Luke recombinante, LukD, o una mezcla de Luke+LukD (Luke/D). La viabilidad celular se controló 1 hora después de la intoxicación usando CellTiter, donde las células tratadas con medio se fijaron al 100% de viabilidad. Los resultados representan el promedio de muestras por triplicado+S.D. Luke/D recombinante purificado no es tóxico para la línea celular humana HL60, como se muestra en la curva de viabilidad celular de la figura 5B. La línea celular HL60 estaba intoxicada como anteriormente y la viabilidad celular se controló 1 hora después de la intoxicación usando CellTiter, donde las células tratadas con medio se fijaron al 100% de viabilidad. Por el contrario, las curvas de viabilidad celular de la figura 5C muestran que Luke/D recombinante purificado es tóxico tanto para neutrófilos primarios humanos (gráfico izquierdo) como murinos primarios (gráfico derecho) (también conocidos como neutrófilos polimorfonucleares o PMN). Los PMN se intoxicaron como anteriormente y la viabilidad celular se controló 1 hora después de la intoxicación usando CellTiter, donde las células tratadas con medio se fijaron al 100% de viabilidad. Luke/D media la citotoxicidad hacia las células huésped THP-1 al formar poros en la membrana celular como se muestra en la figura 5D. Las células THP-1 y HL60 se incubaron con Luke/D purificado, y la formación de poros se midió con un ensayo de incorporación de bromuro de etidio. La fluorescencia media de los experimentos por triplicado se muestra tanto para THP-1 como para HL60. La figura 5E muestra una imagen de microscopía de fluorescencia de la absorción de bromuro de etidio de células tratadas con Luke/D (30 $\mu\text{g/ml}$) y control (sin toxina) de THP-1.

Las figuras 6A-6B ilustran que la citotoxicidad de Luke/D se neutraliza con un anticuerpo policlonal Luke purificado por afinidad. Las células THP-1 se intoxicaron con 1.5 μg de Luke/D recombinante después de la incubación con 0.1 μg de anticuerpo policlonal Luke o suero preinmune. La viabilidad celular (Figura 6A) y la formación de poros (Figura 6B) se controlaron usando CellTiter y bromuro de etidio, respectivamente. Para los ensayos CellTiter, las células tratadas con medio se fijaron al 100% de viabilidad. Los resultados representan el promedio de las muestras por duplicado \pm desviación estándar (S.D.).

30 Descripción detallada de la invención

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de (i) un polipéptido Luke aislado que tiene una longitud de 200-300 aminoácidos y comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 48-291 de SEQ ID NO: 11, (ii) un polipéptido LukD aislado que tiene una longitud de 250-300 aminoácidos y comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 46-307 de SEQ ID NO:22, o (iii) una combinación de los mismos, y un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización de la invención, la composición comprende un polipéptido Luke aislado. En otra realización de la invención, la composición comprende un polipéptido LukD aislado. En otra realización más de la invención, la composición comprende ambos polipéptidos Luke y LukD.

40 La secuencia de aminoácidos de las proteínas Luke de diversas cepas de *S. aureus* se muestra en la tabla 1 a continuación (esto es, SEQ ID Nos: 1-10). La SEQ ID NO: 11 de la tabla 1 es una secuencia consenso de Luke que demuestra el alto nivel de identidad de secuencia en proteínas Luke de diversas cepas de *S. aureus*.

45 La composición comprende un polipéptido inmunogénico aislado de Luke. Los polipéptidos Luke apropiados tienen preferiblemente una longitud entre aproximadamente 200-250 aminoácidos, y más preferiblemente una longitud entre 250-300 aminoácidos. Los residuos de aminoácidos N-terminales de Luke de longitud completa representan la secuencia de secreción/señal nativa. De este modo, la forma madurada secretada de Luke está representada por los residuos de aminoácidos 29-311 en cada una de las SEQ ID NOs: 1-10 y SEQ ID NO: 11. De acuerdo con lo anterior, los residuos de aminoácidos 1-311 en cada una de las SEQ ID NOs: 1-10 y SEQ ID NO: 11 se denominan la forma inmadura de Luke. El polipéptido de Luke de la presente invención comprende los residuos de aminoácidos 48-291.

50 La secuencia de aminoácidos de las proteínas LukD de diversas cepas de *S. aureus* se muestran en la tabla 2 a continuación (esto es, SEQ ID Nos: 12-21). La SEQ ID NO:22 de la tabla 2 es una secuencia consenso de LukD que demuestra el alto nivel de identidad de secuencia en las proteínas LukD de diversas cepas de *S. aureus*.

55 La composición comprende un polipéptido inmunogénico aislado de LukD. Los polipéptidos LukD apropiados tienen una longitud entre 250 y 300 aminoácidos. Los residuos de aminoácidos N-terminales del LukD de longitud completa representan la secuencia de secreción/señal nativa. De este modo, la forma secretada madura de LukD está representada por los residuos de aminoácidos 27-327 en cada una de las SEQ ID NOs: 12-21 y SEQ ID NO:22. De

ES 2 684 088 T3

acuerdo con lo anterior, los residuos de aminoácidos 1-327 de SEQ ID NOs: 12-21 y SEQ ID NO:22 se denominan la forma inmadura de LukD. El polipéptido LukD de la presente invención comprende los residuos de aminoácidos 46-307.

Tabla 1 - Alineación de secuencias de LukE de S. Aureus

Cepa de S. Aureus

Newman	→	MFKKKMLAATLSVGLIAPLASPIQESRANTNIENIGDGAEVIKRTEDVSS 50 SEQ ID NO:1
MW2		MFKKKMLAATLSVGLIAPLASPIQESRANTNIENIGDGAEVIKRTEDVSS 50 SEQ ID NO:2
USA_300_FPR3757		MFKKKMLAATLSVGLIAPLASPIQESRANTNIENIGDGAEVIKRTEDVSS 50 SEQ ID NO:3
COL		MFKKKMLAATLSVGLIAPLASPIQESRANTNIENIGDGAEVIKRTEDVSS 50 SEQ ID NO:4
USA_300_TCH1516		MFKKKMLAATLSVGLIAPLASPIQESRANTNIENIGDGAEVIKRTEDVSS 50 SEQ ID NO:5
N315		MFKKKMLAATLSVGLIAPLASPIQESRANTNIENIGDGAEVIKRTEDVSS 50 SEQ ID NO:6
D30		MFKKKMLAATLSVGLIAPLASPIQESRANTNIENIGDGAEVIKRTEDVSS 50 SEQ ID NO:7
Mu50		MFKKKMLAATLSVGLIAPLASPIQESRANTNIENIGDGAEVIKRTEDVSS 50 SEQ ID NO:8
TCH_70		MFKKKMLAATLSVGLIAPLASPIQESRANTNIENIGDGAEVIKRTEDVSS 50 SEQ ID NO:9
MRSA131		MFKKKMLAATLSVGLIAPLASPIQESRANTNIENIGDGAEVIKRTEDVSS 50 SEQ ID NO:10 *****
Secuencia de consenso de LukE		MFKKKMLAATLSVGLIAPLASPIQESRANTNIENIGDGAEVIKRTEDVSS 50 SEQ ID NO:11

Newman	KKWGV TQNVQDFV KDKKYNKDALIVKMQGFINSRTSFSDVKGSGYELTK 100
MW2	KKWGV TQNVQDFV KDKKYNKDALIVKMQGFINSRTSFSDVKGSGYELTK 100
USA_300_FPR3757	KKWGV TQNVQDFV KDKKYNKDALIVKMQGFINSRTSFSDVKGSGYELTK 100
COL	KKWGV TQNVQDFV KDKKYNKDALIVKMQGFINSRTSFSDVKGSGYELTK 100
USA_300_TCH1516	KKWGV TQNVQDFV KDKKYNKDALIVKMQGFINSRTSFSDVKGSGYELTK 100
N315	KKWGV TQNVQDFV KDKKYNKDALIVKMQGFINSRTSFSDVKGSGYELTK 100
D30	KKWGV TQNVQDFV KDKKYNKDALIVKMQGFINSRTSFSDVKGSGYELTK 100
Mu50	KKWGV TQNVQDFV KDKKYNKDALIVKMQGFINSRTSFSDVKGSGYELTK 100
TCH_70	KKWGV TQNVQDFV KDKKYNKDALIVKMQGFINSRTSFSDVKGSGYELTK 100
MRSA131	KKWGV TQNVQDFV KDKKYNKDALIVKMQGFINSRTSFSDVKGSGYELTK 100 *****

Secuencia de consenso de LukE KKWGV TQNVQDFV KDKKYNKDALIVKMQGFINSRTSFSDVKGSGYELTK

Newman	RMIWPFQYNIGLTTKDPNVSLINYL PKNKIETTDVGQTLGYNIGGNFQSA 150
MW2	RMIWPFQYNIGLTTKDPNVSLINYL PKNKIETTDVGQTLGYNIGGNFQSA 150
USA_300_FPR3757	RMIWPFQYNIGLTTKDPNVSLINYL PKNKIETTDVGQTLGYNIGGNFQSA 150
COL	RMIWPFQYNIGLTTKDPNVSLINYL PKNKIETTDVGQTLGYNIGGNFQSA 150

ES 2 684 088 T3

USA_300_TCH1516 RMIWPFQYNI GLTTKDPNVSLINYL PKNKIETTDV GQTLGYNIGGNFQSA 150
 N315 RMIWPFQYNI GLTTKDPNVSLINYL PKNKIETTDV GQTLGYNIGGNFQSA 150
 D30 RMIWPFQYNI GLTTKDPNVSLINYL PKNKIETTDV GQTLGYNIGGNFQSA 150
 Mu50 RMIWPFQYNI GLTTKDPNVSLINYL PKNKIETTDV GQTLGYNIGGNFQSA 150
 TCH_70 RMIWPFQYNI GLTTKDPNVSLINYL PKNKIETTDV GQTLGYNIGGNFQSA 150
 MRSA131 RMIWPFQYNI GLTTKDPNVSLINYL PKNKIETTDV GQTLGYNIGGNFQSA 150

Secuencia de consenso de LukE RMIWPFQYNI GLTTKDPNVSLINYL PKNKIETTDV GQTLGYNIGGNFQSA

Newman PSIGGN GSFNYSKTISY TQKSYVSEVDKQNSK SVKWGVKANEFVTPDGKK 200
 MW2 PSIGGN GSFNYSKTISY TQKSYVSEVDKQNSK SVKWGVKANEFVTPDGKK 200
 USA_300_FPR3757 PSIGGN GSFNYSKTISY TQKSYVSEVDKQNSK SVKWGVKANEFVTPDGKK 200
 COL PSIGGN GSFNYSKTISY TQKSYVSEVDKQNSK SVKWGVKANEFVTPDGKK 200
 USA_300_TCH1516 PSIGGN GSFNYSKTISY TQKSYVSEVDKQNSK SVKWGVKANEFVTPDGKK 200
 N315 PSIGGN GSFNYSKTISY TQKSYVSEVDKQNSK SVKWGVKANEFVTPDGKK 200
 D30 PSIGGN GSFNYSKTISY TQKSYVSEVDKQNSK SVKWGVKANEFVTPDGKK 200
 Mu50 PSIGGN GSFNYSKTISY TQKSYVSEVDKQNSK SVKWGVKANEFVTPDGKK 200
 TCH_70 PSIGGN GSFNYSKTISY TQKSYVSEVDKQNSK SVKWGVKANEFVTPDGKK 200
 MRSA131 PSIGGN GSFNYSKTISY TQKSYVSEVDKQNSK SVKWGVKANEFVTPDGKK 200

Secuencia de consenso de LukE PSIGGN GSFNYSKTISY TQKSYVSEVDKQNSK SVKWGVKANEFVTPDGKK

Newman SAHD RYLFVQSPNGPTGSAREYFAPDNQLPPLVQSGFNPSFITTLSHEKG 250
 MW2 SAHD RYLFVQSPNGPTGSAREYFAPDNQLPPLVQSGFNPSFITTLSHEKG 250
 USA_300_FPR3757 SAHD RYLFVQSPNGPTGSAREYFAPDNQLPPLVQSGFNPSFITTLSHEKG 250
 COL SAHD RYLFVQSPNGPTGSAREYFAPDNQLPPLVQSGFNPSFITTLSHEKG 250
 USA_300_TCH1516 SAHD RYLFVQSPNGPTGSAREYFAPDNQLPPLVQSGFNPSFITTLSHEKG 250
 N315 SAHD RYLFVQSPNGPTGSAREYFAPDNQLPPLVQSGFNPSFITTLSHEKG 250
 D30 SAHD RYLFVQSPNGPTGSAREYFAPDNQLPPLVQSGFNPSFITTLSHEKG 250
 Mu50 SAHD RYLFVQSPNGPTGSAREYFAPDNQLPPLVQSGFNPSFITTLSHEKG 250
 TCH_70 SAHD RYLFVQSPNGPTGSAREYFAPDNQLPPLVQSGFNPSFITTLSHEKG 250
 MRSA131 SAHD RYLFVQSPNGPTGSAREYFAPDNQLPPLVQSGFNPSFITTLSHEKG 250

Secuencia de SAHD RYLFVQSPNGPTGSAREYFAPDNQLPPLVQSGFNPSFITTLSHEKG

ES 2 684 088 T3

consenso de LukE

Newman	SSDTSEFEISYGRNLDITYATLFPRTGIYAERKHNAFVNRNFVRYEVNW 300
MW2	SSDTSEFEISYGRNLDITYATLFPRTGIYAERKHNAFVNRNFVRYEVNW 300
USA_300_FPR3757	SSDTSEFEISYGRNLDITYATLFPRTGIYAERKHNAFVNRNFVRYEVNW 300
COL	SSDTSEFEISYGRNLDITYATLFPRTGIYAERKHNAFVNRNFVRYEVNW 300
USA_300_TCH1516	SSDTSEFEISYGRNLDITYATLFPRTGIYAERKHNAFVNRNFVRYEVNW 300
N315	SSDTSEFEISYGRNLDITYATLFPRTGIYAERKHNAFVNRNFVRYEVNW 300
D30	SSDTSEFEISYGRNLDITYATLFPRTGIYAERKHNAFVNRNFVRYEVNW 300
Mu50	SSDTSEFEISYGRNLDITYATLFPRTGIYAERKHNAFVNRNFVRYEVNW 300
TCH_70	SSDTSEFEISYGRNLDITYATLFPRTGIYAERKHNAFVNRNFVRYEVNW 300
MRSA131	SSDTSEFEISYGRNLDITYATLFPRTGIYAERKHNAFVNRNFVRYEVNW 300 *****
Secuencia de consenso de LukE	SSDTSEFEISYGRNLDITYATLFPRTGIYAERKHNAFVNRNFVRYEVNW

Newman	KTHEIKVKGHN 311
MW2	KTHEIKVKGHN 311
USA_300_FPR3757	KTHEIKVKGHN 311
COL	KTHEIKVKGHN 311
USA_300_TCH1516	KTHEIKVKGHN 311
N315	KTHEIKVKGHN 311
D30	KTHEIKVKGHN 311
Mu50	KTHEIKVKGHN 311
TCH_70	KTHEIKVKGHN 311
MRSA131	KTHEIKVKGHN 311 *****
Secuencia de consenso de LukE	KTHEIKVKGHN

→ Representa el inicio de la proteína LukE secretada

Tabla 2 - Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de LukD

Newman	→	MKMKKLVKSSVASSIALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT 50 SEQ ID NO:12
MW2		MKMKKLVKSSVASSIALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT 50 SEQ ID NO:13
USA_300_PR3757		MKMKKLVKSSVASSIALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT 50 SEQ ID NO:14

ES 2 684 088 T3

COL MKMKKLVKSSVASSIALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT 50 SEQ ID NO:15
USA_300_ CH1516 MKMKKLVKSSVASSIALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT 50 SEQ ID NO:16
MRSA131 MKMKKLVKSSVASSIALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT 50 SEQ ID NO:17
TCH_70 MKMKKLVKSSVASSIALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT 50 SEQ ID NO:18
D30 MKMKKLVKSSVASSIALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT 50 SEQ ID NO:19
N315 MKMKKLVKSSVASSIALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVSSKITLYKTTAT 50 SEQ ID NO:20

N315 Mu50 MKMKKLVKSSVASSIALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT 50 SEQ ID NO:21

Secuencia de MKMKKLVKSSVASSIALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT 50 SEQ ID NO:22
consenso de LukD

Newman SDNDKLNISQILTFNFIKDKSYDKDTLVLKAAGNINSYKPKPNPKDYNYS 100
MW2 SDNDKLNISQILTFNFIKDKSYDKDTLVLKAAGNINSYKPKPNPKDYNYS 100
USA_300_ PR3757 SDNDKLNISQILTFNFIKDKSYDKDTLVLKAAGNINSYKPKPNPKDYNYS 100
COL SDNDKLNISQILTFNFIKDKSYDKDTLVLKAAGNINSYKPKPNPKDYNYS 100
USA_300_ CH1516 SDNDKLNISQILTFNFIKDKSYDKDTLVLKAAGNINSYKPKPNPKDYNYS 100
MRSA131 SDNDKLNISQILTFNFIKDKSYDKDTLVLKAAGNINSYKPKPNPKDYNYS 100
TCH_70 SDNDKLNISQILTFNFIKDKSYDKDTLVLKAAGNINSYKPKPNPKDYNYS 100
D30 SDNDKLNISQILTFNFIKDKSYDKDTLVLKAAGNINSYKPKPNPKDYNYS 100
N315 SDNDKLNISOILTFNFIKDKSYDKDTLVLKAAGNINSYKPKPNPKDYNYS 100

Mu50 SDNDKLNISQILTFNFIKDKSYDKDTLVLKAAGNINSYKPKPNPKDYNYS 100

Secuencia de SDNDKLNISQILTFNFIKDKSYDKDTLVLKAAGNINSYKPKPNPKDYNYS
consenso de LukD

Newman QFYWGGKYNVSVSSESNDVAVNVVDYAPKNQNEEFQVQQTLGYSYGGDINI 150
MW2 QFYWGGKYNVSVSSESNDVAVNVVDYAPKNQNEEFQVQQTLGYSYGGDINI 150
USA_300_ FPR3757 QFYWGGKYNVSVSSESNDVAVNVVDYAPKNQNEEFQVQQTLGYSYGGDINI 150
COL QFYWGGKYNVSVSSESNDVAVNVVDYAPKNQNEEFQVQQTLGYSYGGDINI 150
USA_300_ TCH1516 QFYWGGKYNVSVSSESNDVAVNVVDYAPKNQNEEFQVQQTLGYSYGGDINI 150
MRSA131 QFYWGGKYNVSVSSESNDVAVNVVDYAPKNQNEEFQVQQTLGYSYGGDINI 150
TCH_70 QFYWGGKYNVSVSSESNDVAVNVVDYAPKNQNEEFQVQQTLGYSYGGDINI 150
D30 QFYWGGKYNVSVSSESNDVAVNVVDYAPKNQNEEFQVQQTLGYSYGGDINI 150
N315 QFYWGGKYNVSVSSESNDVAVNVVDYAPKNQNEEFQVQQTLGYSYGGDINI 150

Mu50 QFYWGGKYNVSVSSESNDVAVNVVDYAPKNQNEEFQVQQTLGYSYGGDINI 150

ES 2 684 088 T3

Secuencia consenso de LukD	de	QFYWGGKYNVSVSSESNDAVNVDYAPKNQNEEFQVQQTLGYSYGGDINI
Newman		SNGLSGGLNGSKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHKSIGWGVEAHKIMNN 200
MW2		SNGLSGGLNGSKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHKSIGWGVEAHKIMNN 200
USA_300_FPR3757		SNGLSGGLNGSKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHKSIGWGVEAHKIMNN 200
COL		SNGLSGGLNGSKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHKSIGWGVEAHKIMNN 200
USA_300_TCH1516		SNGLSGGLNGSKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHKSIGWGVEAHKIMNN 200
MRSA131		SNGLSGGLNGSKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHKSIGWGVEAHKIMNN 200
TCH_70		SNGLSGGLNGSKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHKSIGWGVEAHKIMNN 200
D30		SNGLSGGLNGSKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHKSIGWGVEAHKIMNN 200
N315		SNGLSGGLNGSKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHKSIGWGVEAHKIMNN 200
Mu50		SNGLSGGLNGSKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHKSIGWGVEAHKIMNN 200 *****
Secuencia consenso de LukD	de	SNGLSGGLNGSKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHKSIGWGVEAHKIMNN
Newman		GWGPYGRDSYDPTYGNELFLGGRQSSSNAGQNFLPTHQMPLLARGNFNPE 250
MW2		GWGPYGRDSYDPTYGNELFLGGRQSSSNAGQNFLPTHQMPLLARGNFNPE 250
USA300FPR3757		GWGPYGRDSYDPTYGNELFLGGRQSSSNAGQNFLPTHQMPLLARGNFNPE 250
__ COL		GWGPYGRDSYDPTYGNELFLGGRQSSSNAGQNFLPTHQMPLLARGNFNPE 250
USA_300_TCH1516		GWGPYGRDSYDPTYGNELFLGGRQSSSNAGQNFLPTHQMPLLARGNFNPE 250
MRSA131		GWGPYGRDSYDPTYGNELFLGGRQSSSNAGQNFLPTHQMPLLARGNFNPE 250
TCH_70		GWGPYGRDSYDPTYGNELFLGGRQSSSNAGQNFLPTHQMPLLARGNFNPE 250
D30		GWGPYGRDSYDPTYGNELFLGGRQSSSNAGQNFLPTHQMPLLARGNFNPE 250
N315		GWGPYGRDSYDPTYGNELFLGGRQSSSNAGQNFLPTHQMPLLARGNFNPE 250
Mu50		GWGPYGRDSYDPTYGNELFLGGRQSSSNAGQNFLPTHQMPLLARGNFNPE 250 *****
Secuencia consenso de LukD	de	GWGPYGRDSYDPTYGNELFLGGRQSSSNAGQNFLPTHQMPLLARGNFNPE
Newman		FISVLSHKQNDTKKSKIKVITYQREMDRYTNQWNRLHWVGNNYKNQNTVTF 300
MW2		FISVLSHKQNDTKKSKIKVITYQREMDRYTNQWNRLHWVGNNYKNQNTVTF 300
USA_300_FPR3757		FISVLSHKQNDTKKSKIKVITYQREMDRYTNQWNRLHWVGNNYKNQNTVTF 300
COL		FISVLSHKQNDTKKSKIKVITYQREMDRYTNQWNRLHWVGNNYKNQNTVTF 300
USA_300_TCH1516		FISVLSHKQNDTKKSKIKVITYQREMDRYTNQWNRLHWVGNNYKNQNTVTF 300

MRSA131	FISVLSHKQNDTKKSKIKVTYQREMDRYTNQWNRLHWVGNNYKNQNTVTF 300
TCH_70	FISVLSHKQNDTKKSKIKVTYQREMDRYTNQWNRLHWVGNNYKNQNTVTF 300
D30	FISVLSHKQNDTKKSKIKVTYQREMDRYTNQWNRLHWVGNNYKNQNTVTF 300
N315	FISVLSHKQNDTKKSKIKVTYQREMDRYTNQWNRLHWIGNNYKNQNTVTF 300
Mu50	FISVLSHKQNDTKKSKIKVTYQREMDRYTNQWNRLHWIGNNYKNQNTVTF 300 *****
Secuencia de consenso de LukD	de FISVLSHKQNDTKKSKIKVTYQREMDRYTNQWNRLHWXGNNYKNQNTVTF
Newman	TSTYEVDWQNHTVKLIGTDSKETNPGV 327
MW2	TSTYEVDWQNHTVKLIGTDSKETNPGV 327
USA_300_FPR3757	TSTYEVDWQNHTVKLIGTDSKETNPGV 327
COL	TSTYEVDWQNHTVKLIGTDSKETNPGV 327
USA_300_TCH1516	TSTYEVDWQNHTVKLIGTDSKETNPGV 327
MRSA131	TSTYEVDWQNHTVKLIGTDSKETNPGV 327
TCH_70	TSTYEVDWQNHTVKLIGTDSKETNPGV 327
D30	TSTYEVDWQNHTVKLIGTDSKETNPGV 327
N315	TSTYEVDWQNHTVKLIGTDSKETNPGV 327
Mu50	TSTYEVDWQNHTVKLIGTDSKETNPGV 327 *****
Secuencia de consenso de LukD	de TSTYEVDWQNHTVKLIGTDSKETNPGV

→ Representa el inicio de la proteína LukD secretada

5 De este modo, a menos que se indique lo contrario, tanto las formas inmaduras como las maduras de LukE y LukD nativas, y las secuencias que tienen menos del 100% de similitud con LukE y LukD nativos (esto es, secuencias nativas y análogos del mismo, se refieren colectivamente en este documento como "LukE_" y "LukD_") se pueden usar en los métodos de la presente invención.

10 Las proteínas y polipéptidos LukE y LukD de la invención pueden diferir de los polipéptidos nativos designados como SEQ ID NOS:1-11 y 12-22 respectivamente, en términos de una o más inserciones, sustituciones o deleciones, de aminoácidos adicionales, por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las SEQ ID NOS: 1-22 pueden estar sustituidos por otro aminoácido de una 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 LukE o LukD nativos. Cualquiera de tales análogos de LukE o LukD se puede cribar según los protocolos descritos en este documento (por ejemplo, el ensayo de toxicidad celular y el ensayo de daño a la membrana) para determinar si mantiene la actividad LukE o LukD nativa. Las sustituciones dentro de estas leucocidinas se pueden seleccionar de 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 con carga positiva (básica) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

20 En otras realizaciones, se pueden hacer alteraciones no conservadoras (por ejemplo, una o sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos) con el fin de desintoxicar LukE y/o LukD. El LukE y LukD destoxificados se pueden usar en las composiciones de vacuna activa. Las alteraciones moleculares pueden lograrse mediante métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen la extensión de cebadores en un molde de plásmido usando moldes monocatenarios (Kunkel et al., Proc. Acad. Sci., USA 82:488-492 (1985)), plantillas de ADN bicatenario (Papworth, et

al., *Strategies* 9(3):3-4 (1996), y mediante clonación por PCR (Braman, J. (ed.), *IN VITRO MUTAGENESIS PROTOCOLS*, 2nd ed. Humana Press, Totowa, N.J. (2002)). Los métodos para determinar si una alteración molecular dada en LukE y LukD reduce la citotoxicidad de LukE/D se describen en este documento.

5 En una realización preferida de la presente invención, se utiliza una preparación LukE/LukD altamente purificada. Los ejemplos incluyen proteínas LukE y LukD o polipéptidos purificados a partir de las diversas cepas ejemplificadas en las tablas 1 y 2. Los métodos de purificación de toxinas LukE y LukD son conocidos en la técnica (Gravet et al., 'Characterization of a Novel Structural Member, LukE-LukD, of the Bi-Component Staphylococcal Leucotoxins Family,' *FEBS* 436: 202-208 (1998)). Como se usa en este documento, "proteína o polipéptido aislado" se refiere a una proteína o polipéptido que se ha separado de otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos con los que está asociado de forma natural. La pureza se puede medir mediante cualquier método estándar apropiado, por ejemplo, mediante cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o análisis de HPLC. Una proteína o polipéptido aislado de la invención se puede purificar a partir de una fuente natural, producida por técnicas de ADN recombinante, o por métodos químicos.

15 En una realización de este aspecto de la presente invención, el polipéptido LukE o LukD aislado de la composición está unido a una molécula portadora inmunogénica. En algunos casos, la molécula portadora inmunogénica se puede unir covalente o no covalentemente a la proteína o péptido inmunogénico. Las moléculas portadoras inmunogénicas de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, albúmina de suero bovino, ovoalbúmina de huevo de gallina, hemocianina de lapa californiana, toxoide tetánico, toxoide diftérico, tiroglobulina, un polisacárido capsular neumocócico, CRM 197 y una proteína de la membrana externa meningocócica.

20 En ciertas realizaciones de la presente invención, la composición puede contener adicionalmente uno o más antígenos de *S. aureus* adicionales. Los antígenos de *S. aureus* apropiados incluyen, sin limitación, antígeno de hemolisina alfa, proteína A, antígeno polisacárido de serotipo 336, coagulasa, factor de aglutinación A, factor de aglutinación B, proteína de unión a la fibronectina, proteína de unión a fibrinógeno, proteína de unión a colágeno, proteína de unión a la elastina, una proteína análoga de MHC, una adhesión intracelular de polisacáridos, hemolisina beta, hemolisina delta, hemolisina gamma, leucocidina Panton-Valentine, leucocidina A, leucocidina B, leucocidina M, toxina exfoliativa A, toxina exfoliativa B, proteasa V8, hialuronato liasa, lipasa, estafiloquinasa, una enterotoxina, toxina-1 del síndrome de choque tóxico, poli-N-succinil beta-1" 6 glucosamina, catalasa, beta-lactamasa, ácido teicoico, peptidoglicano, una proteína de unión a la penicilina, proteína inhibidora de la quimiotaxis, inhibidor del complemento, Sbi, antígeno de tipo 5, antígeno de tipo 8, ácido lipoteicoico y proteínas de superficie microbiana que reconocen las proteínas del huésped (por ejemplo, determinantes de superficie de hierro, proteínas repetidas de serina-aspartato).

De acuerdo con este aspecto de la invención, la composición puede comprender además uno o más adyuvantes. Los adyuvantes apropiados son conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, flagelina, adyuvante completo o incompleto de Freund, hidróxido de aluminio, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsión oleosa, dinitrofenol, iscomatriz y partículas de ADN de policación liposómico.

35 En realizaciones en las que la composición terapéutica está destinada para su uso como una vacuna activa, las proteínas o polipéptidos LukE y/o LukD se pueden alterar para mostrar una toxicidad reducida. Las alteraciones para reducir la toxicidad de LukE y LukD incluyen tratamiento químico (por ejemplo, modificación de residuos de aminoácidos específicos como se describe anteriormente) o conjugación a otra unidad estructural (por ejemplo, a otro antígeno bacteriano, tal como un polisacárido bacteriano o una glucoproteína bacteriana). Se conocen alteraciones químicas de otras toxinas de *S. aureus* con fines de desintoxicación (o reducción de la toxicidad). Los métodos para determinar si una alteración dada reduce la toxicidad de LukE o LukD son conocidos en la técnica y/o se describen en este documento.

45 Las composiciones terapéuticas de la presente invención se preparan formulando LukE y LukD con un portador farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se usa en este documento, los términos "portador farmacéuticamente aceptable" y "excipiente farmacéuticamente aceptable" (por ejemplo, aditivos tales como diluyentes, inmunoestimulantes, adyuvantes, antioxidantes, conservantes y agentes solubilizantes) no son tóxicos para la célula o mamífero expuestos a las dosis y concentraciones empleadas. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen agua, por ejemplo, regulada con fosfato, citrato y otro ácido orgánico. Los 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 adyuvante, tal como un ϕ -glucano como se describe en la Patente de los Estados Unidos 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 que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como

EDTA; alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS®.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención se pueden preparar para el almacenamiento mezclando el (los) ingrediente (s) activo (s) que tienen el grado de pureza deseado con el portador farmacéuticamente aceptable y el excipiente opcional y/o el agente activo adicional, en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas.

5 También se describe un método para inmunizar contra una infección por *Staphylococcus aureus* en un sujeto. Este método implica administrar una composición de la presente invención, en una cantidad eficaz para inmunizar contra la infección por *S. aureus* en el sujeto. Un sujeto apropiado para el tratamiento es un sujeto en riesgo de desarrollar una infección por *S. aureus*.

10 Una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición para la administración a un sujeto para inmunizar contra la infección por *S. aureus* es la cantidad necesaria para generar una respuesta inmune humoral (esto es, mediada por anticuerpos). Preferiblemente, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la presente invención induce una respuesta inmune neutralizante contra *S. aureus* en el sujeto. Para efectuar una respuesta inmune eficaz en un sujeto, la composición puede contener adicionalmente uno o más antígenos de *S. aureus* adicionales o un adyuvante como se describe anteriormente. En una realización alternativa, el adyuvante se administra por separado de la composición al sujeto, ya sea antes, después o concurrentemente con la administración de la composición de la presente invención.

Los modos de administración y la dosificación terapéuticamente eficaz se describen a continuación.

También se describe una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo de la leucocidina E (LukE), un anticuerpo de la leucocidina D (LukD), o una combinación de los mismos, y un portador farmacéuticamente aceptable.

20 En una realización, la composición comprende un anticuerpo LukE o fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos LukE apropiados incluyen aquellos anticuerpos que reconocen uno o más epítomos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. Asimismo, en otra realización, la composición comprende un anticuerpo LukD o fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos LukD apropiados reconocen uno o más epítomos en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:22. En otra realización, la composición comprende tanto anticuerpos LukE como LukD o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Preferiblemente, la composición comprende uno o más anticuerpos neutralizadores LukE y/o LukD. En otra realización más, la composición de anticuerpo anti-LukE y/o anti-LukD es multivalente ya que también contiene un anticuerpo que se une específicamente a otro antígeno bacteriano (y que opcionalmente neutraliza el otro antígeno bacteriano). Por ejemplo, la composición puede comprender uno o más anticuerpos que reconocen uno o más antígenos de *S. aureus* adicionales, que incluyen, sin limitación, uno o más de los antígenos de *S. aureus* descritos anteriormente.

35 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos, formas genéticamente modificadas de los anticuerpos y combinaciones de los mismos. Más específicamente, el término "anticuerpo", que se usa indistintamente con el término "inmunoglobulina", incluye moléculas de inmunoglobulina de longitud completa (esto es, que se producen de forma natural o formadas por procedimientos de recombinación de inmunoglobulinas normales) (por ejemplo, un anticuerpo IgG) y fragmentos inmunológicamente activos de los mismos (esto es, que incluyen la porción de unión específica de la molécula de inmunoglobulina de longitud completa), que de nuevo puede ser de origen natural o de síntesis. De acuerdo con lo anterior, 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 se une específicamente a LukE, LukD o un complejo LukE/D. Los métodos para la preparación y el cribado de fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

45 Los anticuerpos anti-LukE pueden tener cierto grado de reactividad cruzada con otras subunidades S de *Staphylococcus leucocidin* tales como HlgC, LukS-PVL, HlgA, LukS-I, LukA y LukM. Asimismo, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-LukD de la presente invención pueden tener cierto grado de reactividad cruzada con otras subunidades F de *Staphylococcus leucocidin* tales como LukF'-PV, LukF-PV, LukB, LukF-I y HlgB. Los anticuerpos anti-LukE y/o anti-LukD pueden inhibir o reducir la actividad de LukE y la actividad de LukD, respectivamente. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-LukE y/o anti-LukD neutralizan (por ejemplo, Eliminan sustancialmente) la actividad LukE y LukD, respectivamente.

50 Los anticuerpos naturales tienen por lo general 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 enlaces disulfuro múltiples que unen adicionalmente las dos cadenas pesadas entre sí. Las cadenas individuales pueden doblarse en dominios que tienen tamaños similares (110-125 aminoácidos) y estructuras, pero diferentes funciones. La cadena ligera puede comprender un dominio variable (VL) y/o un dominio constante (CL). La cadena pesada también puede comprender un dominio variable (VH) y/o, dependiendo de la clase o isotipo de anticuerpo, tres o cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4). En humanos, los isotipos son IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y IgA e IgG se subdividen 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, denominadas regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR), se encuentran en cada uno de VL y VH, que son compatibles con regiones menos variables llamadas regiones variables de marco. Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales IgG así como fragmentos de anticuerpos o formas modificadas por ingeniería genética. Estos son, por ejemplo, fragmentos Fv, o proteínas en las que las CDR y/o los dominios variables de los anticuerpos ejemplificados se modifican mediante ingeniería genética como proteínas de unión a antígeno de monocatenario.

La porción de un anticuerpo que consiste en los dominios VL y VH se designa como Fv (variable de Fragmento) y constituye el sitio de unión al antígeno. Un Fv de monocatenario (scFv o SCA) es un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio VL y un dominio VH en una cadena polipeptídica, en el que el extremo N de un dominio y el término C del otro dominio están unidos por un enlazante flexible. Los enlazantes peptídicos usados para producir los anticuerpos monocatenarios son por lo general péptidos flexibles, seleccionados para asegurar que se produce el plegamiento tridimensional apropiado de los dominios VL y VH. El enlazante tiene 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 dichos péptidos enlazantes incluye repeticiones de cuatro residuos de glicina seguidos por un residuo de serina.

Los anticuerpos monocatenarios 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 completos. Por ejemplo, los anticuerpos monocatenarios tienden a estar libres de ciertas interacciones indeseadas entre regiones constantes de cadena pesada y otras moléculas biológicas. Además, los anticuerpos monocatenarios son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y pueden tener una mayor permeabilidad que los anticuerpos completos, permitiendo que los anticuerpos monocatenarios se localicen y se unan a los sitios diana de unión al antígeno de manera más eficiente. Además, el tamaño relativamente pequeño de los anticuerpos monocatenarios hace que sea menos probable que provoquen una respuesta inmune no deseada en un receptor que los anticuerpos completos.

Fab (Fragmento, unión a antígeno) se refiere a los fragmentos del anticuerpo que consisten en los dominios VL, CL, VH y CH1. Los que se generan después de la digestión con papaína simplemente se denominan Fab y no retienen la región bisagra de la cadena pesada. Después de la digestión con pepsina, se generan diversos Fab que retienen la bisagra de la cadena pesada. Los 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 retienen. Los fragmentos F(ab')₂ tienen mayor avidéz por el antígeno que los fragmentos Fab monovalentes.

Fc (cristalización de fragmentos) 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 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 de anticuerpos (ADCC). Para anticuerpos tales como IgA e IgM, que son complejos de múltiples proteínas similares a IgG, la formación de complejos requiere dominios constantes de Fc.

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

"Especificidad de anticuerpo" se refiere al reconocimiento selectivo del anticuerpo para 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 interactuar de otro modo con una molécula. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o carbohidratos o cadenas laterales de 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) ocurren linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. En un epítipo conformacional, los puntos de interacción se producen a través de residuos de aminoácidos en la proteína que están separados entre sí, esto es, los aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen por lo general en la exposición a solventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden por lo general en el tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítipo por lo general incluye al menos 3, y más habitualmente, al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una conformación espacial única. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo se pueden verificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

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 apropiado) se transfiere a dominios variables pesados y ligeros humanos. Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo se derivan de los de un anticuerpo humano. Los métodos para fabricar anticuerpos humanizados son bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos quiméricos preferiblemente tienen regiones constantes derivadas sustancialmente o exclusivamente de regiones constantes de anticuerpos humanos y regiones variables derivadas de manera sustancial o exclusiva de la secuencia de la región variable de un mamífero distinto de un ser humano. El procedimiento de quimerización puede hacerse más efectivo reemplazando también las regiones variables distintas de las regiones hipervariables o las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo murino (u otro mamífero no humano) con las secuencias humanas correspondientes. Las regiones variables distintas de las CDR también se conocen como regiones marco variables (FR). Sin embargo, otros anticuerpos monoclonales son biespecíficos, ya que tienen especificidad tanto para LukE como para LukD. Los anticuerpos biespecíficos son preferiblemente humanos o humanizados.

Los anticuerpos descritos anteriormente se pueden obtener según técnicas estándar. Por ejemplo, LukE, LukD, o un fragmento inmunológicamente activo de LukE o LukD se pueden administrar a un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano o un ratón). Las leucocidinas se pueden usar por sí mismas como inmunógenos o se pueden unir a una proteína transportadora u otros objetos, tales como perlas de sefarosa. Después de que el mamífero ha producido anticuerpos, se aísla una mezcla de células productoras de anticuerpos, tales como esplenocitos, a partir de la cual se pueden obtener anticuerpos policlonales. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse aislando células productoras de anticuerpos individuales 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.

También se describe un método para prevenir una infección por *S. aureus* y/o afecciones asociadas con *S. aureus* en un sujeto. Este método comprende administrar una composición que comprende un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo de la leucocidina E (LukE), un anticuerpo de la leucocidina D (LukD), o una combinación de los mismos, en una cantidad eficaz para prevenir la infección por *S. aureus* y/o afección asociada con *S. aureus* en el sujeto.

Las afecciones asociadas a *S. aureus* incluyen, sin limitación, heridas e infecciones de la piel, abscesos tisulares, foliculitis, osteomielitis, neumonía, síndrome de la piel escaldada, septicemia, artritis séptica, miocarditis, endocarditis y síndrome de choque tóxico.

Los modos de administración y la dosificación terapéuticamente eficaz se describen a continuación.

También se describe un método de tratamiento de una infección por *S. aureus* y/o afecciones asociadas con *S. aureus* en un sujeto. Este método implica la administración de una composición que comprende uno o más inhibidores de la citotoxicidad mediada por LukE/D en una cantidad eficaz para tratar la infección por *S. aureus* y/o la afección asociada a *S. aureus* en el sujeto.

Los inhibidores apropiados de la citotoxicidad mediada por LukE/D incluyen inhibidores de proteínas o péptidos, inhibidores de ácidos nucleicos o inhibidores de moléculas pequeñas.

En una realización, el inhibidor de la citotoxicidad mediada por LukE/D es un inhibidor de LukE. Los inhibidores de LukE apropiados incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que reconocen un epítipo en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11. En otra realización, el inhibidor de la citotoxicidad mediada por LukE/D es un inhibidor de LukD. Los inhibidores de LukD apropiados incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que reconocen un epítipo en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:22.

En otra realización, el inhibidor de la citotoxicidad mediada por LukE/D inhibe la interacción de LukE y LukD. Los inhibidores apropiados según esta realización incluyen anticuerpos anti-LukE y/o LukD que se dirigen a las regiones de interacción de LukE o LukD. Alternativamente, los inhibidores apropiados incluyen moléculas pequeñas que se unen a las regiones de interacción de LukE y/o LukD. Estas regiones de interacción pueden incluir los aminoácidos 3-13 de SEQ ID NO: 11, los aminoácidos 32-47 de SEQ ID NO: 11, los aminoácidos 126-139 de SEQ ID NO: 11, los aminoácidos 151-156 de SEQ ID NO: 11, y los aminoácidos 272 - 283 de la SEQ ID NO: 11. Las regiones de interacción también pueden incluir los aminoácidos: 3-17 de SEQ ID NO:22, los aminoácidos 33-51 de SEQ ID NO:22, los aminoácidos 94-113 de SEQ ID NO:22, los aminoácidos 115-131 de SEQ ID NO:22, y los aminoácidos 229-274 de SEQ ID NO:22.

En otra realización, el inhibidor de la citotoxicidad mediada por LukE/D inhibe la unión de LukE/D a la membrana plasmática de los leucocitos. Los inhibidores apropiados incluyen anticuerpos o moléculas pequeñas que reconocen los epítopos de LukE y/o LukD que interactúan con la membrana plasmática de los leucocitos. Las regiones de LukE y LukD que interactúan con la membrana plasmática incluyen los aminoácidos que abarcan el dominio del borde de LukE. Estas regiones de aminoácidos incluyen los aminoácidos 57-75 de LukE, de SEQ ID NO: 11, los aminoácidos 162-198 de SEQ ID NO: 11, y los aminoácidos 230-273 de SEQ ID NO: 11 y los aminoácidos 59-75 de LukD de SEQ ID NO:22, los aminoácidos 170-220 de SEQ ID NO:22, y los aminoácidos 253-268 de SEQ ID NO:22. De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos que reconocen estos epítopos de LukE y/o LukD son particularmente apropiados.

5 En otra realización, el inhibidor de la citotoxicidad mediada por LukE/D es un agente que previene la formación del complejo oligómero LukE/D, un agente que bloquea la formación de poros mediada por LukE/LukD o un agente que bloquea el poro LukE/LukD. De acuerdo con esta realización, los inhibidores apropiados del poro mediado por LukE/LukD incluyen ciclodextrina y compuestos relacionados, y cualquier otro inhibidor de poros que incluye inhibidores de proteínas o péptidos, inhibidores de ácidos nucleicos o inhibidores de moléculas pequeñas.

10 En otra realización más, el inhibidor de la citotoxicidad mediada por LukE/D es un agente que modula la expresión y/o actividad de un represor o activador endógeno de la expresión de LukE/D. De acuerdo con lo anterior, administrar un agente que induce o imita la expresión y/o actividad de represor de toxinas ('Rot_'), que es un represor de las expresiones lukE y lukD, inhibe la citotoxicidad mediada por LukE/D en virtud del bloqueo de la producción de toxinas. Los agentes apropiados que imitan la expresión y actividad de Rot y se describen en la Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2003/0171563 de McNamara. Del mismo modo, la administración de un agente que inhibe la expresión o actividad de SaeRS, que es un activador de las expresiones lukE y lukD, inhibe la citotoxicidad mediada por LukE/D en virtud del bloqueo de la producción de toxinas.

15 El "sujeto" diana abarca cualquier animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. En el contexto de la administración de una composición de la invención con el fin de prevenir una infección por *S. aureus* en un sujeto, el sujeto diana abarca cualquier sujeto que esté en riesgo de ser infectado por *S. aureus*. Los sujetos particularmente susceptibles incluyen niños y jóvenes, así como jóvenes, adultos y adultos mayores inmunocomprometidos. Sin embargo, cualquier niño, joven, adulto, o anciano o individuo inmunocomprometido con riesgo de infección por *S. aureus* se puede tratar de acuerdo con los métodos de la presente invención. En el contexto de la administración de una composición de la invención con el fin de tratar una infección por *S. aureus* en un sujeto, la población del sujeto diana abarca cualquier sujeto infectado con *S. aureus*. Los sujetos particularmente apropiados incluyen aquellos en riesgo de infección o aquellos infectados con *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) o *S. aureus* sensible a metilicina (MSSA).

20 En el contexto del uso de composiciones terapéuticas de la presente invención para prevenir una infección por *S. aureus*, ya sea mediante vacunación activa o pasiva, la concentración de los polipéptidos LukE y LukD en la composición son adecuados para lograr la prevención de la infección por *S. aureus*, particularmente la prevención de *S. aureus* en poblaciones susceptibles. En el contexto del uso de composiciones terapéuticas para tratar una infección por *S. aureus*, las cantidades de anticuerpos anti-LukE y anti-LukD o agentes que inhiben la citotoxicidad mediada por LukE/D son capaces de lograr una reducción en una serie de síntomas, una disminución en la gravedad de al menos un síntoma, o un retraso en la progresión posterior de al menos un síntoma, o incluso un alivio total de la infección.

25 Las cantidades terapéuticamente eficaces de anticuerpos LukE, LukD, anti-LukE y anti-LukD, y agentes que inhiben la citotoxicidad mediada por LukE/D se pueden determinar de acuerdo con procedimientos estándar, que tienen en cuenta numerosos factores, que incluyen, por ejemplo, las concentraciones de estos agentes activos en la composición, el modo y la frecuencia de administración, la gravedad de la infección por *S. aureus* que se va a tratar (o prevenir) y los detalles del sujeto, tales como edad, peso y estado general de salud e inmunidad. Se pueden encontrar orientaciones generales, por ejemplo, en las publicaciones de the International Conference on Harmonization y en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Company 1990). Un médico puede administrar anticuerpos LukE y LukD o anti-LukE y anti-LukD, hasta que se alcance una dosis que proporcione el efecto profiláctico o terapéutico deseado o requerido. El progreso de esta terapia se puede controlar fácilmente mediante ensayos convencionales.

30 Las cantidades terapéuticamente eficaces de LukE y LukD para la inmunización dependerán de si el adyuvante se coadministra, siendo necesarias dosis más altas en ausencia de adyuvante. La cantidad de LukE y LukD para la administración a veces varía de 1≈g-500≈g por paciente y más habitualmente de 5-500≈g por inyección para administración humana. Ocasionalmente, se usa una dosis más alta de 1-2 mg por inyección. Por lo general, se usan aproximadamente 10, 20, 50 o 100 ≈g para cada inyección humana. Preferiblemente, las cantidades de LukE y LukD son sustancialmente las mismas. El momento de las inyecciones puede variar significativamente de una vez al día, a una vez al año, a una vez a la década. Generalmente, se puede controlar una dosificación eficaz obteniendo una muestra de fluido del sujeto, generalmente una muestra de suero sanguíneo, y determinando el título de anticuerpo desarrollado contra la proteína o polipéptido LukE y LukD, usando métodos bien conocidos en la técnica y fácilmente adaptables al antígeno específico que se va a medir. Idealmente, se toma una muestra antes de la dosificación inicial y se toman muestras posteriores y se titula después de cada inmunización. Generalmente, es deseable una dosis o programa de dosificación que proporcione un título detectable al menos cuatro veces mayor que los niveles de control o "de referencia" a una dilución de suero de 1:100, donde la referencia se define con relación a un suero control o relativo a una referencia de placa en los ensayos ELISA.

35 La cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones de anticuerpos LukE y LukD por lo general es de al menos 50 mg de composición por kilogramo de peso corporal (mg/kg), que incluye 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 dosificaciones para composiciones de anticuerpos monoclonales pueden tender a ser más bajas, tales como aproximadamente una décima parte de 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. En algunos métodos, se administran

simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo habitualmente se administra en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpos en el sujeto.

5 Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el sujeto. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguidos por anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico.

10 En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduce o finaliza, y preferiblemente hasta que el sujeto muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención se pueden administrar como parte de una terapia de combinación junto con otro agente activo, dependiendo de la naturaleza 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. Agentes antibióticos representativos y agentes antimicrobianos que pueden ser útiles en la presente invención incluyen penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos resistentes a la penicilinas, que incluyen 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, MERCK MANUAL OF DIAGNOSIS AND THERAPY, Section 13, Ch. 157, 100th 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 invención de la presente invención. En ciertas realizaciones, la administración se repite. El sujeto puede ser un niño, un joven, un adulto o un anciano. El sujeto también puede ser un joven, adulto o anciano inmunocomprometido.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención se pueden administrar en una única dosis, 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 realizaciones que incluyen terapia antibiótica convencional, que generalmente implica dosis múltiples durante un período de días o semanas, los antibióticos pueden tomarse una, dos o tres o más veces al día durante un período de tiempo, tal como durante al menos 5 días, 10 días o incluso 14 o más días, mientras que la composición del anticuerpo generalmente se administra solo una o dos veces. Sin embargo, las diferentes dosificaciones, el momento de las dosificaciones y las cantidades relativas de la composición terapéutica y los antibióticos se pueden seleccionar y ajustar por un experto habitual en el arte.

Las composiciones para la presente invención se pueden administrar por medios parenteral, tópico, intravenoso, oral, subcutáneo, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico. La vía de administración más típica es subcutánea, aunque otras pueden ser igualmente eficaces. El próximo más común es la inyección intramuscular. Este tipo de inyección generalmente se realiza en los músculos del brazo o la pierna. Las inyecciones intravenosas, así como las inyecciones intraperitoneales, las inyecciones intraarteriales, intracraneales o intradérmicas también son eficaces para generar una respuesta inmune.

Los agentes farmacéuticos de la presente invención se pueden formular para administración parenteral. Las soluciones o suspensiones del agente se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un surfactante tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos en aceites. Los aceites ilustrativos son aquellos de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja o aceite mineral. En general, agua, solución salina, dextrosa acuosa y solución de azúcar relacionada, y glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol, son portadores líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formulaciones farmacéuticas apropiadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe preservar contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas apropiadas de los mismos y aceites vegetales.

Cuando es deseable administrar los agentes farmacéuticos de la presente invención sistémicamente, se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en

ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

5 La administración intraperitoneal o intratecal de los agentes de la presente invención también se puede lograr usando dispositivos de bomba de infusión tales como los descritos por Medtronic, Northridge, CA. Dichos dispositivos permiten la infusión continua de compuestos deseados evitando múltiples inyecciones y múltiples manipulaciones.

10 Además de las formulaciones descritas previamente, los agentes también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden formular con materiales poliméricos o hidrófobos apropiados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble.

15 También se describe un método para predecir la gravedad de una infección por *S. aureus*. Este método implica cultivar *S. aureus* obtenido de un sujeto infectado a través de una muestra de fluido o tejido del sujeto y cuantificar la expresión de LukE y/o LukD en *S. aureus* cultivado. Las cantidades cuantificadas de LukE y/o LukD en la muestra del sujeto se comparan con la cantidad de LukE y/o LukD en una muestra de control que produce cantidades pequeñas o indetectables de LukE y/o LukD y la gravedad de la infección por *S. aureus* se predice en base a dicha comparación.

20 También se describe un método de tratamiento de un sujeto con una infección por *S. aureus*. Este método implica cultivar *S. aureus* obtenido de un sujeto infectado a través de una muestra de fluido o tejido del sujeto y cuantificar la expresión de LukE y/o LukD en *S. aureus* cultivado. Las cantidades cuantificadas de LukE y/o LukD en la muestra del sujeto se comparan con la cantidad de LukE y/o LukD en una muestra control que produce cantidades pequeñas o indetectables de LukE y/o LukD, y un tratamiento apropiado para el sujeto se determina en base a esta comparación. El método implica además administrar el tratamiento apropiado determinado al sujeto para tratar la infección por *S. aureus*.

25 La cuantificación de la expresión de LukE y LukD en la muestra del sujeto implica medir el nivel de expresión de ARNm LukE y/o LukD o la producción de proteína. Los métodos para cuantificar los niveles de expresión de ARNm y proteína en una muestra son bien conocidos en la técnica. Un nivel incrementado de expresión de ARNm de LukE y/o LukD o producción de proteína en la muestra del sujeto en comparación con la muestra de control indica o predice que el sujeto tiene o tendrá una infección por *S. aureus* más grave. Asimismo, un nivel aumentado de expresión de ARNm LukE y/o LukD o producción de proteína en la muestra del sujeto indica que un tratamiento apropiado para el sujeto que tiene la infección implica uno o más agentes que inhiben la citotoxicidad mediada por LukE/D. Los agentes apropiados para inhibir la citotoxicidad de LukE/D se describen anteriormente.

30 También se describe un método para identificar inhibidores de citotoxicidad de LukE/D. Este método implica proporcionar una población celular, una preparación que contenga LukE y LukD, y un inhibidor de LukE/D candidato. La población celular se expone a la preparación que contiene LukE y LukD en presencia y ausencia del inhibidor candidato, y la citotoxicidad mediada por LukE/D se mide en presencia y en ausencia del inhibidor candidato. Se compara la cantidad medida de citotoxicidad en presencia y en ausencia del inhibidor candidato y se identifica un inhibidor de la
35 citotoxicidad de LukE/D en base a esta comparación.

40 Los anticuerpos anti-LukE y anti-LukD, y fragmentos de los mismos, así como otras unidades estructurales terapéuticas potenciales (por ejemplo, pequeñas moléculas orgánicas) se pueden cribar para evaluar su capacidad para inhibir la citotoxicidad mediada por LukE/D. Como se describe a continuación, se han diseñado diversos métodos para identificar agentes que inhiben algún aspecto de la cascada de eventos que conduce a la citotoxicidad mediada por LukE/D y a la lisis de leucocitos humanos. Los métodos también están diseñados para identificar formas alteradas de LukE y LukD que poseen toxicidad reducida en relación con sus contrapartes nativas. Los eventos dirigidos que forman parte de la cascada incluyen, por ejemplo, unión de LukE y/o LukD a membranas plasmáticas de leucocitos, interacción entre LukE y LukD (oligomerización de LukE/D) y bloqueo del poro de membrana formado por el oligómero LukE/D. Los formatos de ensayo generalmente requieren leucocitos humanos (o porciones de unión a la membrana LukE o LukD del mismo),
45 medio de cultivo apropiado, y LukE y LukD purificados.

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

50 Los siguientes métodos generalmente se dirigen a la identificación de agentes que inhiben la citotoxicidad de LukE/D, sin revelar necesariamente el evento exacto en la cascada que se ve afectado.

Para identificar los inhibidores de la citotoxicidad de LukE/D, los leucocitos humanos (por ejemplo, THP-1) se pueden sembrar en placas en una placa tratada con cultivo de tejido negra de fondo transparente de 384 pocillos (Corning) a 5×10^3 células/pocillo en un volumen final de 50 μ l de RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS). Después, las células se pueden poner en contacto/mezclar/reaccionar/tratar con el
55 compuesto/molécula de ensayo ($\sim 5 \mu$ l/concentraciones diferentes) y luego intoxicarse con LukE y LukD, que en las realizaciones preferidas están sustancialmente purificadas (5 μ l de una solución ~ 0.01 -5 μ M), preferiblemente añadidos

juntos, en condiciones de cultivo para permitir la intoxicación de los leucocitos por LukE y LukD, por ejemplo, durante 1 hora a 37 °C, 5% de CO₂. Como controles, las células se pueden tratar con medio de cultivo (100% viable) y con Triton X100 al 0.1% v/v (100% de muerte).

5 En estas realizaciones, las células tratadas como se describió anteriormente se pueden incubar con un colorante para controlar la viabilidad celular tal como CellTiter (Promega) (que permite determinar la viabilidad celular mediante absorción midiendo el número de células viables en un cultivo mediante cuantificación de la actividad metabólica de las células) e incubar durante un período de tiempo adicional (por ejemplo, aproximadamente 2 horas a 37 °C, 5% de CO₂). La viabilidad celular puede entonces determinarse tal como midiendo la reacción colorimétrica a 492 nm usando un lector de placas, por ejemplo, el lector multietiqueta Envision 2103 (Perkin-Elmer). El porcentaje de células viables se puede calcular usando la siguiente ecuación: % de viabilidad = $100 \times \frac{(Ab_{492} \text{ Muestra} - Ab_{492} \text{ TritonX})}{(Ab_{492} \text{ Medio de cultivo de tejidos})}$. Un aumento en la viabilidad del 100% sugiere la inhibición de la citotoxicidad mediada por LukE/D.

15 Una variación de este ensayo se denomina ensayo de daño de membrana. En estas realizaciones, las células tratadas como se describió anteriormente (por ejemplo, hasta e incluyendo el tratamiento de las células con compuesto/molécula de prueba y luego intoxicar las células con LukE y LukD purificados), se pueden luego incubar con un colorante fluorescente impermeable a las células tal como SYTOX verde (0.1 μM; Invitrogen) (según las instrucciones del fabricante) e incubar, por ejemplo, durante 15 minutos adicionales a temperatura ambiente en la oscuridad. La fluorescencia, como un indicador del daño de la membrana, se puede medir luego usando un lector de placas tal como lector Multietiqueta Envision 2103 (Perkin-Elmer) a excitación 485nm, emisión 535nm. Una disminución en la fluorescencia sugiere la inhibición de la citotoxicidad de LukE/D.

20 En otra variación de este ensayo, las células tratadas como se describió anteriormente (por ejemplo, hasta e incluyendo el tratamiento de las células con el compuesto de prueba y luego intoxicando las células con LukE y LukD purificados), se pueden luego incubar con un marcador de lisis celular e incubar durante un período adicional de tiempo a temperatura ambiente en la oscuridad. Se mide el marcador de la lisis celular, y una disminución en el nivel de lisis celular en presencia del compuesto indica la inhibición de la citotoxicidad de LukE/D.

25 Juntos, estos ensayos facilitarán la identificación de compuestos que inhiben o reducen los efectos citotóxicos de Luke/D hacia las células leucocitarias.

30 Se pueden usar métodos adicionales, independientemente o junto con los métodos descritos anteriormente, particularmente si los métodos anteriores revelan actividad inhibitoria, que permitirán a una persona experta en el campo determinar con mayor precisión qué evento en la cascada bioquímica se ve afectado. o dirigido por el agente. Estos eventos incluyen la unión de LukE y/o LukD a las membranas de los leucocitos, la unión de LukE a LukD (oligomerización de LukE/D) y el bloqueo del poro de la membrana formado por los oligómeros LukE/D.

35 También se describe un método para identificar inhibidores de la unión de LukE, LukD y/o Luke/D a células diana. Este método implica proporcionar una población de leucocitos u otras células diana, una preparación que contiene un LukE LukD, o Luke/D marcado detectablemente, y un inhibidor candidato. La población celular se expone a la preparación que contiene LukE, LukD o Luke/D marcados detectablemente en presencia y ausencia del inhibidor candidato, y la unión de LukE, LukD o Luke/D marcada a la población de leucocitos se mide en presencia y ausencia del inhibidor candidato. Se compara la cantidad medida de LukE, LukD o Luke/D en presencia y en ausencia del inhibidor candidato y se identifica un inhibidor de la unión de LukE, LukD o Luke/D-leucocito en base a esta comparación.

40 Para detectar inhibidores que bloquean o reducen la unión de LukE, LukD o Luke/D a células diana, que es la primera etapa en el procedimiento de intoxicación, los leucocitos humanos (por ejemplo, células THP-1) se pueden sembrar en placas en 384 pocillos de fondo plano tratadas con cultivo tisular (Corning) a 2.5×10^3 células/pocillo en un volumen final de 50 μl de RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS). Las células se pueden tratar luego con el compuesto/molécula de prueba (~5 μl/concentraciones diferentes) y se pueden incubar con LukE, LukD y/o Luke/D marcados fluorescentemente y purificados (por ejemplo, FITC, Cy3, Cy5, APC, PE) 5 μl de una solución ~0.01-5 μM durante 1 hora a 4 °C, 5% de CO₂. Para evaluar la eficacia de los compuestos/moléculas probadas, la fluorescencia asociada a células se puede medir como un indicador de unión de LukE, LukD o Luke/D a las células, por ejemplo, usando un sistema de imagen microscópico de fluorescencia automatizado diseñado para cribado de alto contenido y análisis de alto contenido (por ejemplo, Cellomics ArrayScan HCS Reader (Thermo Scientific) (excitación 485nm, emisión 535nm)). De acuerdo con este aspecto de la invención, una disminución en la unión de LukE, LukD o Luke/D-leucocitos en presencia del inhibidor candidato en comparación con en su ausencia identifica un inhibidor de unión.

55 Para cribar inhibidores que bloquean o reducen la interacción de Luke/LukD, que es la segunda etapa en el procedimiento de intoxicación, los leucocitos humanos (por ejemplo, células THP-1) se pueden sembrar en placas tratadas con cultivo de tejido de fondo plano de 384 pocillos (Corning) a 2.5×10^3 células/pocillo en un volumen final de 50 μl de RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS). Las células se pueden tratar entonces con el compuesto/molécula de prueba y luego intoxicar con una mezcla de LukE purificado y LukD purificado, donde LukD se marca fluorescentemente con una molécula de fluorescencia tal como FITC, Cy3, Cy5, APC y

5 PE, y se deja reposar para completar el procedimiento de intoxicación (por ejemplo, durante 1 hora a 37 °C, 5% de CO₂). Para evaluar la eficacia de los compuestos/moléculas ensayados, la fluorescencia LukD-FITC asociada a células se puede medir como un indicador de la interacción LukE/LukD-FITC, usando, por ejemplo, un sistema de imagen microscópico de fluorescencia automatizado diseñado para un cribado de alto contenido y análisis de alto contenido (por ejemplo, un Celloomics ArrayScan HCS Reader (Thermo Scientific) (excitación 485nm, emisión 535nm). Se podrían realizar experimentos similares usando LukE marcado fluorescentemente en lugar de LukD.

10 También se describe un método para identificar inhibidores de la formación de poros mediada por LukE/D. Este método implica proporcionar una población de leucocitos, una preparación que contiene LukE y LukD, y un inhibidor candidato. La población de leucocitos se expone a la preparación que contiene LukE y LukD en presencia y ausencia del inhibidor candidato, y la formación de poros en la población de leucocitos se mide en presencia y en ausencia del inhibidor candidato. Se compara la cantidad medida de formación de poros en presencia y en ausencia del inhibidor candidato, y se identifica un inhibidor de la formación de poros mediada por LukE/D en base a esa comparación.

15 Para cribar inhibidores que bloquean o inhiben la formación del poro LukE/D, la molécula efectora que conduce a la lisis celular, los leucocitos humanos (por ejemplo, células THP-1) se pueden sembrar en placas negras de fondo claro de 384 pocillos tratadas con cultivo en tejido (Corning) a 2.5×10^3 células/pocillo en un volumen final de 50 μ l de RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS). Las células se pueden tratar luego con el compuesto/molécula de prueba (~5 μ l que contienen diferentes concentraciones) y luego intoxicar con LukE y LukD o LukE/D purificados (~0.01-5 μ M) durante 15 minutos a 37 °C, 5% de CO₂. Como controles, las células se pueden tratar con medio de cultivo (control negativo) y con 0.1% v/v de TritonX100 (control positivo).

20 Para evaluar directamente los poros LukE/D en la superficie de las células huésped, se puede usar un ensayo de flujo de bromuro de etidio (EB). EB es un colorante catiónico pequeño que es impermeable a las células huésped sanas. Tras la formación de poros catiónicos por LukE/D, EB entra en las células y se une al ADN, lo que da como resultado la fluorescencia. Las células tratadas de esta manera se pueden luego incubar 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 LukE/D, la fluorescencia se puede medir como un indicador de formación de poros, usando un lector de placas tal como el lector multietiqueta Envision 2103 (Perkin-Elmer) a excitación 530 nm. Este ensayo facilitará la identificación de moléculas que pueden bloquear o inhibir el poro LukE/D, lo que aliviará la toxicidad mediada por LukE/D.

30 Para evaluar directamente los poros LukE/D en la superficie de las células huésped, se puede usar un ensayo de flujo de bromuro de etidio (EB). EB es un colorante catiónico pequeño que es impermeable a las células huésped sanas. Tras la formación de poros catiónicos por LukE/D, el EB entra en las células y se une al ADN, lo que da como resultado la fluorescencia (véase, por ejemplo, la figura 5E). Las células tratadas con un agente causante de la formación de poros LukE/D se pueden luego incubar con EB (5 μ M) durante 5 minutos adicionales a temperatura ambiente en la oscuridad. Para evaluar la eficacia de los compuestos/moléculas probados en la inhibición de la formación de poros LukE/D, la fluorescencia se puede medir como un indicador de formación de poros, usando un lector de placas como el lector multietiqueta Envision 2103 (Perkin-Elmer) a excitación 530 nm., emisión 590nm. Este ensayo facilitará la identificación de moléculas que pueden bloquear o inhibir el poro de LukE/D, lo que aliviará la toxicidad mediada por LukE/D.

40 Los compuestos candidatos usados en los ensayos descritos en este documento pueden ser esencialmente cualquier compuesto o composición que se sospeche que sea capaz de afectar las funciones o interacciones biológicas. El compuesto o composición puede ser parte de una biblioteca de compuestos o composiciones. Alternativamente, el compuesto o composiciones se pueden diseñar específicamente para interactuar o interferir con la actividad biológica de LukE, LukD o LukE/D de la presente invención.

Ejemplos

45 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar las realizaciones de la presente invención, pero de ningún modo pretenden limitar su alcance.

Ejemplo 1 - Inactivación de *rot* mejora la virulencia de una cepa de *S. aureus* que carece de *agr*.

50 En estudios recientes se ha encontrado que cepas mutantes de *S. aureus* que carecen tanto del regulador principal conocido como el regulador génico accesorio ("Agr₁") y el represor del factor de transcripción de toxinas ("Rot₁") (esto es, Δ *agr* Δ *rot*) presentan una mayor virulencia en un modelo murino de infección sistémica en comparación con el mutante Δ *agr* altamente atenuado. Mientras que un único mutante de delección de Δ *agr* está muy atenuado para la virulencia medida por la supervivencia a lo largo del tiempo después de la infección, un doble mutante de Δ *agr* Δ *rot* muestra características de virulencia similares a la de la cepa original (WT Newman) (Figura 1A). Se especuló que la virulencia incrementada observada en un mutante doble de Δ *agr* Δ *rot* podría deberse a una expresión aumentada de leucotoxinas de *S. aureus* ya que se cree que muchas de estas toxinas están reguladas de una manera dependiente de Agr-Rot. De hecho, el análisis de inmunotransferencia de las toxinas producidas por *S. aureus* tipo salvaje, Δ *agr*, y las cepas

mutantes de $\Delta agr \Delta rot$ confirmó la hipótesis ya que se restauraron varias toxinas a los niveles de WT en un mutante doble de $\Delta agr \Delta rot$ (Figura 1B). Sorprendentemente, se observó que LukE/D es altamente producido en exceso por la cepa de $\Delta agr \Delta rot$ en comparación con las otras toxinas (Figura 1B). Estos datos demuestran que la represión de los factores de virulencia clave por Rot es crítica para el potencial de virulencia óptimo en *S. aureus* y que la leucotoxina LukE/D está fuertemente reprimida de una manera dependiente de *rot*, más que otras leucotoxinas.

Ejemplo 2: LukE/D contribuye a la virulencia mejorada presentada por una cepa de *S. aureus* que carece de *rot*

Los resultados descritos en las figuras 1A-1B indicaron que la inactivación de *rot* en una cepa *agr+* también podría dar como resultado una virulencia incrementada, posiblemente de una manera dependiente de LukE/D. Al igual que con el mutante doble de $\Delta agr \Delta rot$ (Figura 1A), se observó que un mutante de delección único de Δrot también resultó en una mayor virulencia en un modelo murino de infección sistémica, como lo demuestra la disminución en el porcentaje de supervivencia de los animales infectados con Δrot en comparación con aquellos infectados con WT (Figura 2A). Las observaciones anteriores demostraron que Rot es probablemente un importante represor de la leucotoxina LukE/D. Para confirmar estos hallazgos en el contexto del único mutante de delección de Δrot , se realizaron inmunotransferencias. Estos experimentos revelaron que, de hecho, LukE/D es altamente producido en ausencia de *rot*, al contrario que LukAB, γ -hemolisina (HlgC) o α -toxina (Hla, Figura 2B). Estos hallazgos reforzaron aún más la suposición de que LukE/D es el principal factor reprimido por Rot responsable del aumento de la virulencia de un mutante Δrot y que LukE/D podría desempeñar un papel significativo en la patogénesis in vivo de *S. aureus*. Para determinar si la sobreproducción LukE/D era responsable del fenotipo patogénico mejorado de Δrot , se construyó un doble mutante $\Delta rot \Delta lukE/D$ y se evaluó su virulencia en un modelo de infección murino. El doble mutante $\Delta rot \Delta lukE/D$ se vio comprometido significativamente por la virulencia como se evidencia por la sorprendente reducción de la mortalidad en comparación con ambos WT, así como el mutante Δrot (Figura 2C). Estos resultados demuestran que LukE/D es un factor reprimido por Rot importante, que es crítico para la hipervirulencia asociada con un mutante Δrot y que LukE/D puede ser un contribuyente principal a la enfermedad en general. Estos datos indican además que los fármacos que mejoran la represión mediada por Rot de los genes diana reducirán la patogénesis de *S. aureus*.

Ejemplo 3: Rot reprime la expresión de LukE/D mediante unión directa al promotor LukE/D

Para examinar adicionalmente la influencia de Rot en la expresión del gen *lukE/D*, se construyeron fusiones transcripcionales de la región promotora *lukE/D* a un gen que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) y se midió la fluorescencia a lo largo del tiempo en cultivo en caldo usando cepas WT, Δagr , Δrot y $\Delta agr \Delta rot$. Como se sospechaba, la expresión génica de *lukE/D* se incrementó sobre la de WT en cepas que carecían de Rot, mientras que las cepas que expresaban grandes cantidades de Rot (mutantes Δagr muestran niveles aumentados de Rot) disminuyeron en la expresión. Para evaluar si la represión de *lukE/D* por Rot es directa, se examinó la capacidad de Rot para unirse al promotor *lukE/D* usando una estrategia de despliegue de promotor. Los lisados de células enteras bacterianas se incubaron con ADN del promotor *lukE/D* o ADN intergénico no específico unido a perlas magnéticas. La inmunotransferencia de proteínas unidas demostró que Rot de hecho se une al promotor *lukE/D* de una manera específica (Figura 3B). Estos resultados implican a Rot como un represor directo de la expresión del gen *lukE/D*. Las alteraciones en los niveles de *rot* podrían, de este modo, aumentar o disminuir sustancialmente la producción de LukE/D y, por consiguiente, modular el potencial de virulencia de *S. aureus*.

Ejemplo 4: LukE/D contribuye significativamente a la patogénesis de *S. aureus*

No solo un mutante de delección doble de $\forall rot \forall lukE/D$ elimina la hipervirulencia asociada con una delección de *rot*, sino que también reduce sustancialmente la virulencia en general (compárese la supervivencia de WT con la supervivencia de $\forall rot \forall lukE/D$ Figura 3B). Para probar si LukE/D juega un papel importante en la patogénesis de la infección septicémica de *S. aureus*, se construyó un mutante $\Delta lukE/D$ en la cepa Newman (Figuras 4A y 4B) y el impacto de la delección de *lukE/D* solo en la virulencia fue examinado. La supervivencia a lo largo del tiempo aumentó drásticamente para los ratones infectados con 10^7 o 10^8 CFU del mutante $\Delta lukE/D$ en comparación con el tipo salvaje. Todos los ratones de tipo salvaje sucumbieron a la infección en 250 horas a la dosis 10^7 (figura 4C) y en 100 horas a la dosis 10^8 (figura 4D). Sin embargo, en ambos casos, casi el 100% de los ratones infectados con el mutante $\Delta lukE/D$ sobrevivieron hasta al menos 300 horas después de la infección, un fenotipo que se complementa completamente con la cepa $\Delta lukE/D:: plukE/D$ (Figuras 4B y 4C). Además, la carga bacteriana en el riñón se reduce en 10 veces en comparación con las cepas naturales o complementadas (Figura 4E) y la formación de abscesos se reduce significativamente (Figura 4F). Estos resultados muestran que LukE/D es de hecho un factor de virulencia crítico para la infección sistémica por *S. aureus*. Por lo tanto, LukE/D es un nuevo y atractivo objetivo para el desarrollo de nuevas terapias para contrarrestar la infección por *S. aureus*.

Ejemplo 5: LukE/D dirige y mata leucocitos

Para determinar el mecanismo de acción potencial de LukE/D, se expresaron y purificaron las proteínas LukE y LukD recombinantes de *E. coli*. Para evaluar la posible toxicidad de estas proteínas, se incubaron células humanas monocíticas (THP-1s) y células de leucemia promielocítica humana (HL60) con diferentes concentraciones de subunidades individuales (esto es, LukE o LukD) o una mezcla de LukE+LukD (LukE/D). Las células se intoxicaron con una respuesta a la dosis de LukE solo, LukD solo o LukE/D y después de 1 hora de intoxicación se añadió CellTiter para

- medir el porcentaje de células viables después de la intoxicación. La línea celular similar a monocitos humanos, THP-1, era especialmente sensible a la intoxicación con ambas subunidades de la toxina juntas, pero no subunidades individuales. La potencia de la toxina hacia las células fue dosis-dependiente y estrictamente requirió la presencia de ambas subunidades (Figura 5A). Por el contrario, las HL60 no se vieron afectadas por ninguna subunidad sola o incubadas juntas (Figura 5B). Además de las líneas celulares, también se examinó la actividad de LukE/D hacia los PMN humanos y murinos primarios. Las células se intoxicaron con una respuesta a la dosis de LukE solo, LukD solo o LukE/D y después de 1 hora de intoxicación se añadió CellTiter para medir el porcentaje de células viables después de la intoxicación. LukE/D, pero no LukE o LukD fue marcadamente citotóxico para PMN tanto de humanos como de ratones (Figura 5C).
- 10 Para examinar el mecanismo por el cual LukE/D es tóxico para THP-1, las células se intoxicaron en presencia de bromuro de etidio, un colorante catiónico pequeño que normalmente es impermeable a las membranas de la célula huésped, pero que puede obtener acceso a la célula a través del poro de la toxina. Tras la adición de ambas subunidades de toxina, el bromuro de etidio se absorbió rápidamente en las células como se refleja por un aumento de la fluorescencia relativa en comparación con los controles no intoxicados y los PMN-HL60 intoxicados (Figuras 5D y 5E).
- 15 Estos experimentos demuestran que cuando están juntos, LukE y LukD presentan citotoxicidad hacia el tipo celular inmunitario humano específico, pero no a otros, destacando la especificidad de esta toxina.

Ejemplo 6 - Anticuerpos contra la citotoxicidad de LukE/D potentemente neutralizada de LukE

- Para determinar si los anticuerpos policlonales producidos contra LukE son capaces de neutralizar la citotoxicidad de LukE/D, se realizó un ensayo de neutralización. La incubación de LukE/D con anticuerpos anti-LukE purificados inhibió potentemente la citotoxicidad mediada por LukE/D hacia las células THP-1 medida por CellTiter (Figura 6A). Como se muestra en las figuras 5A-5E, LukE/D parece ejercer su actividad tóxica formando poros permeables en la membrana plasmática de las células diana. Para obtener información sobre el mecanismo por el cual anti-LukE neutraliza la citotoxicidad de LukE/D, se controló la formación de poros LukE/D en células intoxicadas con LukE/D en presencia de anticuerpos anti-LukE purificados. Se observó que la formación de poros de LukE/D era potentemente inhibida por el anticuerpo anti-LukE (Figura 6B). Estos datos demuestran que la inmunización con LukE genera anticuerpos neutralizantes anti-LukE, lo que sugiere que los anticuerpos específicos de LukE podrían ser una nueva terapéutica para combatir la infección por *S. aureus*.

Lista de secuencias

- <110> New York University TORRES, Víctor J. ALONZO, Francis
- 30 <120> Métodos de tratamiento y prevención de infecciones por estafilococo aureus y afecciones asociadas
- <130> 29527.1042
- <140> PCT/US12/43179
- <141> 2012-06-19
- <150> 61/498,596
- 35 <151> 2011-06-19
- <160> 22
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 311
- 40 <212> PRT
- <213> *Staphylococcus aureus*
- <400> 1

ES 2 684 088 T3

Met Phe Lys Lys Lys Met Leu Ala Ala Thr Leu Ser Val Gly Leu Ile
 1 5 10 15

Ala Pro Leu Ala Ser Pro Ile Gln Glu Ser Arg Ala Asn Thr Asn Ile
 20 25 30

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

Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln Phe Asp Phe Val
 50 55 60

Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val Lys Met Gln Gly
 65 70 75 80

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

Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly Leu
 100 105 110

Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys Asn
 115 120 125

Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Gly
 130 135 140

ES 2 684 088 T3

Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser Phe Asn
 145 150 155 160

Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr Val Ser Glu Val
 165 170 175

Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val Lys Ala Asn Glu
 180 185 190

Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp Arg Tyr Leu Phe
 195 200 205

Val Gln Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Ser Ala Arg Glu Tyr Phe Ala
 210 215 220

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
 225 230 235 240

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
 245 250 255

Phe Glu Ile Ser Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Ile Thr Tyr Ala Thr Leu
 260 265 270

Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His Asn Ala Phe Val
 275 280 285

Asn Arg Asn Phe Val Val Arg Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu
 290 295 300

Ile Lys Val Lys Gly His Asn
 305 310

<210> 2

<211> 311

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 2

Met Phe Lys Lys Lys Met Leu Ala Ala Thr Leu Ser Val Gly Leu Ile
 1 5 10 15

Ala Pro Leu Ala Ser Pro Ile Gln Glu Ser Arg Ala Asn Thr Asn Ile
 20 25 30

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

ES 2 684 088 T3

Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln Phe Asp Phe Val
50 55 60

Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val Lys Met Gln Gly
65 70 75 80

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

Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly Leu
100 105 110

Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys Asn
115 120 125

Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Gly
130 135 140

Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser Phe Asn
145 150 155 160

Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr Val Ser Glu Val
165 170 175

Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val Lys Ala Asn Glu
180 185 190

Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp Arg Tyr Leu Phe
195 200 205

Val Gln Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Ser Ala Arg Glu Tyr Phe Ala
210 215 220

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
225 230 235 240

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
245 250 255

Phe Glu Ile Ser Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Ile Thr Tyr Ala Thr Leu
260 265 270

Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His Asn Ala Phe Val
275 280 285

Asn Arg Asn Phe Val Val Arg Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu
290 295 300

Ile Lys Val Lys Gly His Asn
305 310

<210> 3

<211> 311

5 <212> PRT

ES 2 684 088 T3

<213> Staphylococcus aureus

<400> 3

```

Met Phe Lys Lys Lys Met Leu Ala Ala Thr Leu Ser Val Gly Leu Ile
 1                               5                               10                               15

Ala Pro Leu Ala Ser Pro Ile Gln Glu Ser Arg Ala Asn Thr Asn Ile
      20                               25                               30

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

Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln Phe Asp Phe Val
      50                               55                               60

Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val Lys Met Gln Gly
65                               70                               75                               80

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

Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly Leu
      100                              105                              110

Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys Asn
      115                              120                              125

Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Gly
      130                              135                              140

Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser Phe Asn
145                              150                              155                              160

Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr Val Ser Glu Val
      165                              170                              175

Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val Lys Ala Asn Glu
      180                              185                              190

Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp Arg Tyr Leu Phe
      195                              200                              205

```

ES 2 684 088 T3

Val Gln Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Ser Ala Arg Glu Tyr Phe Ala
 210 215 220

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
 225 230 235 240

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
 245 250 255

Phe Glu Ile Ser Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Ile Thr Tyr Ala Thr Leu
 260 265 270

Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His Asn Ala Phe Val
 275 280 285

Asn Arg Asn Phe Val Val Arg Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu
 290 295 300

Ile Lys Val Lys Gly His Asn
 305 310

<210> 4

<211> 311

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 4

Met Phe Lys Lys Lys Met Leu Ala Ala Thr Leu Ser Val Gly Leu Ile
 1 5 10 15

Ala Pro Leu Ala Ser Pro Ile Gln Glu Ser Arg Ala Asn Thr Asn Ile
 20 25 30

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

Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln Phe Asp Phe Val
 50 55 60

Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val Lys Met Gln Gly
 65 70 75 80

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

Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly Leu
 100 105 110

ES 2 684 088 T3

Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys Asn
 115 120 125

Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Gly
 130 135 140

Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser Phe Asn
 145 150 155 160

Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr Val Ser Glu Val
 165 170 175

Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val Lys Ala Asn Glu
 180 185 190

Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp Arg Tyr Leu Phe
 195 200 205

Val Gln Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Ser Ala Arg Glu Tyr Phe Ala
 210 215 220

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
 225 230 235 240

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
 245 250 255

Phe Glu Ile Ser Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Ile Thr Tyr Ala Thr Leu
 260 265 270

Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His Asn Ala Phe Val
 275 280 285

Asn Arg Asn Phe Val Val Arg Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu
 290 295 300

Ile Lys Val Lys Gly His Asn
 305 310

<210> 5

<211> 311

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 5

Met Phe Lys Lys Lys Met Leu Ala Ala Thr Leu Ser Val Gly Leu Ile
 1 5 10 15

ES 2 684 088 T3

Ala Pro Leu Ala Ser Pro Ile Gln Glu Ser Arg Ala Asn Thr Asn Ile
 20 25 30

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

Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln Phe Asp Phe Val
 50 55 60

Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val Lys Met Gln Gly
 65 70 75 80

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

Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly Leu
 100 105 110

Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys Asn
 115 120 125

Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Gly
 130 135 140

Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser Phe Asn
 145 150 155 160

Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr Val Ser Glu Val
 165 170 175

Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val Lys Ala Asn Glu
 180 185 190

Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp Arg Tyr Leu Phe
 195 200 205

Val Gln Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Ser Ala Arg Glu Tyr Phe Ala
 210 215 220

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
 225 230 235 240

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
 245 250 255

Phe Glu Ile Ser Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Ile Thr Tyr Ala Thr Leu

ES 2 684 088 T3

260 265 270

Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His Asn Ala Phe Val
 275 280 285

Asn Arg Asn Phe Val Val Arg Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu
 290 295 300

Ile Lys Val Lys Gly His Asn
 305 310

<210> 6

<211> 311

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 6

Met Phe Lys Lys Lys Met Leu Ala Ala Thr Leu Ser Val Gly Leu Ile
 1 5 10 15

Ala Pro Leu Ala Ser Pro Ile Gln Glu Ser Arg Ala Asn Thr Asn Ile
 20 25 30

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

Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln Phe Asp Phe Val
 50 55 60

Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val Lys Met Gln Gly
 65 70 75 80

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

Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly Leu
 100 105 110

Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys Asn
 115 120 125

Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Gly
 130 135 140

Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser Phe Asn
 145 150 155 160

Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr Val Ser Glu Val

ES 2 684 088 T3

```

65              70              75              80

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

Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly Leu
      100             105             110

Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys Asn
      115             120             125

Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Gly
      130             135             140

Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser Phe Asn
      145             150             155             160

Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr Val Ser Glu Val
      165             170             175

Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val Lys Ala Asn Glu
      180             185             190

Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp Arg Tyr Leu Phe
      195             200             205

Val Gln Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Ser Ala Arg Glu Tyr Phe Ala
      210             215             220

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
      225             230             235             240

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
      245             250             255

Phe Glu Ile Ser Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Ile Thr Tyr Ala Thr Leu
      260             265             270

Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His Asn Ala Phe Val
      275             280             285

Asn Arg Asn Phe Val Val Arg Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu
      290             295             300

Ile Lys Val Lys Gly His Asn
      305             310

```

<210> 8

<211> 311

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 8

ES 2 684 088 T3

Met Phe Lys Lys Lys Met Leu Ala Ala Thr Leu Ser Val Gly Leu Ile
 1 5 10 15

Ala Pro Leu Ala Ser Pro Ile Gln Glu Ser Arg Ala Asn Thr Asn Ile
 20 25 30

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

Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln Phe Asp Phe Val
 50 55 60

Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val Lys Met Gln Gly
 65 70 75 80

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

Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly Leu
 100 105 110

Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys Asn
 115 120 125

Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Gly
 130 135 140

Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser Phe Asn
 145 150 155 160

Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr Val Ser Glu Val
 165 170 175

Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val Lys Ala Asn Glu
 180 185 190

Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp Arg Tyr Leu Phe
 195 200 205

Val Gln Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Ser Ala Arg Glu Tyr Phe Ala
 210 215 220

ES 2 684 088 T3

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
 225 230 235 240

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
 245 250 255

Phe Glu Ile Ser Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Ile Thr Tyr Ala Thr Leu
 260 265 270

Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His Asn Ala Phe Val
 275 280 285

Asn Arg Asn Phe Val Val Arg Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu
 290 295 300

Ile Lys Val Lys Gly His Asn
 305 310

<210> 9

<211> 311

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 9

Met Phe Lys Lys Lys Met Leu Ala Ala Thr Leu Ser Val Gly Leu Ile
 1 5 10 15

Ala Pro Leu Ala Ser Pro Ile Gln Glu Ser Arg Ala Asn Thr Asn Ile
 20 25 30

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

Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln Phe Asp Phe Val
 50 55 60

Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val Lys Met Gln Gly
 65 70 75 80

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

Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly Leu
 100 105 110

Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys Asn
 115 120 125

ES 2 684 088 T3

Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Gly
 130 135 140

Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser Phe Asn
 145 150 155 160

Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr Val Ser Glu Val
 165 170 175

Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val Lys Ala Asn Glu
 180 185 190

Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp Arg Tyr Leu Phe
 195 200 205

Val Gln Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Ser Ala Arg Glu Tyr Phe Ala
 210 215 220

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
 225 230 235 240

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
 245 250 255

Phe Glu Ile Ser Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Ile Thr Tyr Ala Thr Leu
 260 265 270

Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His Asn Ala Phe Val
 275 280 285

Asn Arg Asn Phe Val Val Arg Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu
 290 295 300

Ile Lys Val Lys Gly His Asn
 305 310

<210> 10

<211> 311

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 10

Met Phe Lys Lys Lys Met Leu Ala Ala Thr Leu Ser Val Gly Leu Ile
 1 5 10 15

Ala Pro Leu Ala Ser Pro Ile Gln Glu Ser Arg Ala Asn Thr Asn Ile
 20 25 30

ES 2 684 088 T3

Glu Asn Ile Gly Asp Gly Ala Glu Val Ile Lys Arg Thr Glu Asp Val
 35 40 45
 Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln Phe Asp Phe Val
 50 55 60
 Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val Lys Met Gln Gly
 65 70 75 80
 Phe Ile Asn Ser Arg Thr Ser Phe Ser Asp Val Lys Gly Ser Gly Tyr
 85 90 95
 Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly Leu
 100 105 110
 Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys Asn
 115 120 125
 Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Gly
 130 135 140
 Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser Phe Asn
 145 150 155 160
 Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr Val Ser Glu Val
 165 170 175
 Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val Lys Ala Asn Glu
 180 185 190
 Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp Arg Tyr Leu Phe
 195 200 205
 Val Gln Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Ser Ala Arg Glu Tyr Phe Ala
 210 215 220
 Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
 225 230 235 240
 Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
 245 250 255
 Phe Glu Ile Ser Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Ile Thr Tyr Ala Thr Leu
 260 265 270
 Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His Asn Ala Phe Val
 275 280 285
 Asn Arg Asn Phe Val Val Arg Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu
 290 295 300
 Ile Lys Val Lys Gly His Asn
 305 310

ES 2 684 088 T3

<210> 11

<211> 311

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

5 <400> 11

```

Met Phe Lys Lys Lys Met Leu Ala Ala Thr Leu Ser Val Gly Leu Ile
 1           5           10           15

Ala Pro Leu Ala Ser Pro Ile Gln Glu Ser Arg Ala Asn Thr Asn Ile
      20           25           30

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

Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln Phe Asp Phe Val
      50           55           60

Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val Lys Met Gln Gly
 65           70           75           80

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

Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly Leu
      100          105          110

Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys Asn
      115          120          125

Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Gly
      130          135          140

Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser Phe Asn
 145          150          155          160

Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr Val Ser Glu Val
      165          170          175

Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val Lys Ala Asn Glu
      180          185          190

```

ES 2 684 088 T3

Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp Arg Tyr Leu Phe
 195 200 205

Val Gln Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Ser Ala Arg Glu Tyr Phe Ala
 210 215 220

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
 225 230 235 240

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
 245 250 255

Phe Glu Ile Ser Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Ile Thr Tyr Ala Thr Leu
 260 265 270

Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His Asn Ala Phe Val
 275 280 285

Asn Arg Asn Phe Val Val Arg Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu
 290 295 300

Ile Lys Val Lys Gly His Asn
 305 310

<210> 12

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 12

Met Lys Met Lys Lys Leu Val Lys Ser Ser Val Ala Ser Ser Ile Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Asn Thr Val Asp Ala Ala Gln His Ile Thr Pro
 20 25 30

Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asp Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
 50 55 60

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

Ala Ala Gly Asn Ile Asn Ser Gly Tyr Lys Lys Pro Asn Pro Lys Asp
 85 90 95

ES 2 684 088 T3

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

<210> 13

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 13

ES 2 684 088 T3

Met Lys Met Lys Lys Leu Val Lys Ser Ser Val Ala Ser Ser Ile Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Asn Thr Val Asp Ala Ala Gln His Ile Thr Pro
20 25 30

Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
35 40 45

Ala Thr Ser Asp Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
50 55 60

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

Ala Ala Gly Asn Ile Asn Ser Gly Tyr Lys Lys Pro Asn Pro Lys Asp
85 90 95

Tyr Asn Tyr Ser Gln Phe Tyr Trp Gly Gly Lys Tyr Asn Val Ser Val
100 105 110

Ser Ser Glu Ser Asn Asp Ala Val Asn Val Val Asp Tyr Ala Pro Lys
115 120 125

Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln Gln Thr Leu Gly Tyr Ser Tyr
130 135 140

Gly Gly Asp Ile Asn Ile Ser Asn Gly Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly
145 150 155 160

Ser Lys Ser Phe Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg
165 170 175

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

Glu Ala His Lys Ile Met Asn Asn Gly Trp Gly Pro Tyr Gly Arg Asp
195 200 205

Ser Tyr Asp Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu Phe Leu Gly Gly Arg Gln
210 215 220

Ser Ser Ser Asn Ala Gly Gln Asn Phe Leu Pro Thr His Gln Met Pro
225 230 235 240

ES 2 684 088 T3

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

His Lys Gln Asn Asp Thr Lys Lys Ser Lys Ile Lys Val Thr Tyr Gln
 260 265 270

Arg Glu Met Asp Arg Tyr Thr Asn Gln Trp Asn Arg Leu His Trp Val
 275 280 285

Gly Asn Asn Tyr Lys Asn Gln Asn Thr Val Thr Phe Thr Ser Thr Tyr
 290 295 300

Glu Val Asp Trp Gln Asn His Thr Val Lys Leu Ile Gly Thr Asp Ser
 305 310 315 320

Lys Glu Thr Asn Pro Gly Val
 325

<210> 14

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 14

Met Lys Met Lys Lys Leu Val Lys Ser Ser Val Ala Ser Ser Ile Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Asn Thr Val Asp Ala Ala Gln His Ile Thr Pro
 20 25 30

Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asp Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
 50 55 60

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

Ala Ala Gly Asn Ile Asn Ser Gly Tyr Lys Lys Pro Asn Pro Lys Asp
 85 90 95

Tyr Asn Tyr Ser Gln Phe Tyr Trp Gly Gly Lys Tyr Asn Val Ser Val
 100 105 110

Ser Ser Glu Ser Asn Asp Ala Val Asn Val Val Asp Tyr Ala Pro Lys
 115 120 125

ES 2 684 088 T3

Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln Gln Thr Leu Gly Tyr Ser Tyr
 130 135 140

Gly Gly Asp Ile Asn Ile Ser Asn Gly Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly
 145 150 155 160

Ser Lys Ser Phe Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg
 165 170 175

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

Glu Ala His Lys Ile Met Asn Asn Gly Trp Gly Pro Tyr Gly Arg Asp
 195 200 205

Ser Tyr Asp Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu Phe Leu Gly Gly Arg Gln
 210 215 220

Ser Ser Ser Asn Ala Gly Gln Asn Phe Leu Pro Thr His Gln Met Pro
 225 230 235 240

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

His Lys Gln Asn Asp Thr Lys Lys Ser Lys Ile Lys Val Thr Tyr Gln
 260 265 270

Arg Glu Met Asp Arg Tyr Thr Asn Gln Trp Asn Arg Leu His Trp Val
 275 280 285

Gly Asn Asn Tyr Lys Asn Gln Asn Thr Val Thr Phe Thr Ser Thr Tyr
 290 295 300

Glu Val Asp Trp Gln Asn His Thr Val Lys Leu Ile Gly Thr Asp Ser
 305 310 315 320

Lys Glu Thr Asn Pro Gly Val
 325

<210> 15

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 15

Met Lys Met Lys Lys Leu Val Lys Ser Ser Val Ala Ser Ser Ile Ala
 1 5 10 15

ES 2 684 088 T3

Leu Leu Leu Leu Ser Asn Thr Val Asp Ala Ala Gln His Ile Thr Pro
 20 25 30
 Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Asp Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
 50 55 60
 Asn Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr Asp Lys Asp Thr Leu Val Leu Lys
 65 70 75 80
 Ala Ala Gly Asn Ile Asn Ser Gly Tyr Lys Lys Pro Asn Pro Lys Asp
 85 90 95
 Tyr Asn Tyr Ser Gln Phe Tyr Trp Gly Gly Lys Tyr Asn Val Ser Val
 100 105 110
 Ser Ser Glu Ser Asn Asp Ala Val Asn Val Val Asp Tyr Ala Pro Lys
 115 120 125
 Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln Gln Thr Leu Gly Tyr Ser Tyr
 130 135 140
 Gly Gly Asp Ile Asn Ile Ser Asn Gly Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly
 145 150 155 160
 Ser Lys Ser Phe Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg
 165 170 175
 Thr Thr Ile Asp Arg Lys Thr Asn His Lys Ser Ile Gly Trp Gly Val
 180 185 190
 Glu Ala His Lys Ile Met Asn Asn Gly Trp Gly Pro Tyr Gly Arg Asp
 195 200 205
 Ser Tyr Asp Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu Phe Leu Gly Gly Arg Gln
 210 215 220
 Ser Ser Ser Asn Ala Gly Gln Asn Phe Leu Pro Thr His Gln Met Pro
 225 230 235 240
 Leu Leu Ala Arg Gly Asn Phe Asn Pro Glu Phe Ile Ser Val Leu Ser
 245 250 255
 His Lys Gln Asn Asp Thr Lys Lys Ser Lys Ile Lys Val Thr Tyr Gln

ES 2 684 088 T3

260 265 270

Arg Glu Met Asp Arg Tyr Thr Asn Gln Trp Asn Arg Leu His Trp Val
 275 280 285

Gly Asn Asn Tyr Lys Asn Gln Asn Thr Val Thr Phe Thr Ser Thr Tyr
 290 295 300

Glu Val Asp Trp Gln Asn His Thr Val Lys Leu Ile Gly Thr Asp Ser
 305 310 315 320

Lys Glu Thr Asn Pro Gly Val
 325

<210> 16

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 16

Met Lys Met Lys Lys Leu Val Lys Ser Ser Val Ala Ser Ser Ile Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Asn Thr Val Asp Ala Ala Gln His Ile Thr Pro
 20 25 30

Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asp Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
 50 55 60

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

Ala Ala Gly Asn Ile Asn Ser Gly Tyr Lys Lys Pro Asn Pro Lys Asp
 85 90 95

Tyr Asn Tyr Ser Gln Phe Tyr Trp Gly Gly Lys Tyr Asn Val Ser Val
 100 105 110

Ser Ser Glu Ser Asn Asp Ala Val Asn Val Val Asp Tyr Ala Pro Lys
 115 120 125

Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln Gln Thr Leu Gly Tyr Ser Tyr
 130 135 140

Gly Gly Asp Ile Asn Ile Ser Asn Gly Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly

ES 2 684 088 T3

Gly Asn Asn Tyr Lys Asn Gln Asn Thr Val Thr Phe Thr Ser Thr Tyr
 290 295 300

Glu Val Asp Trp Gln Asn His Thr Val Lys Leu Ile Gly Thr Asp Ser
 305 310 315 320

Lys Glu Thr Asn Pro Gly Val
 325

<210> 18

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 18

Met Lys Met Lys Lys Leu Val Lys Ser Ser Val Ala Ser Ser Ile Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Asn Thr Val Asp Ala Ala Gln His Ile Thr Pro
 20 25 30

Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asp Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
 50 55 60

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

Ala Ala Gly Asn Ile Asn Ser Gly Tyr Lys Lys Pro Asn Pro Lys Asp
 85 90 95

Tyr Asn Tyr Ser Gln Phe Tyr Trp Gly Gly Lys Tyr Asn Val Ser Val
 100 105 110

Ser Ser Glu Ser Asn Asp Ala Val Asn Val Val Asp Tyr Ala Pro Lys
 115 120 125

Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln Gln Thr Leu Gly Tyr Ser Tyr
 130 135 140

Gly Gly Asp Ile Asn Ile Ser Asn Gly Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly
 145 150 155 160

Ser Lys Ser Phe Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg
 165 170 175

ES 2 684 088 T3

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

Glu Ala His Lys Ile Met Asn Asn Gly Trp Gly Pro Tyr Gly Arg Asp
 195 200 205

Ser Tyr Asp Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu Phe Leu Gly Gly Arg Gln
 210 215 220

Ser Ser Ser Asn Ala Gly Gln Asn Phe Leu Pro Thr His Gln Met Pro
 225 230 235 240

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

His Lys Gln Asn Asp Thr Lys Lys Ser Lys Ile Lys Val Thr Tyr Gln
 260 265 270

Arg Glu Met Asp Arg Tyr Thr Asn Gln Trp Asn Arg Leu His Trp Val
 275 280 285

Gly Asn Asn Tyr Lys Asn Gln Asn Thr Val Thr Phe Thr Ser Thr Tyr
 290 295 300

Glu Val Asp Trp Gln Asn His Thr Val Lys Leu Ile Gly Thr Asp Ser
 305 310 315 320

Lys Glu Thr Asn Pro Gly Val
 325

<210> 19

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 19

Met Lys Met Lys Lys Leu Val Lys Ser Ser Val Ala Ser Ser Ile Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Asn Thr Val Asp Ala Ala Gln His Ile Thr Pro
 20 25 30

Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asp Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
 50 55 60

ES 2 684 088 T3

Asn Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr Asp Lys Asp Thr Leu Val Leu Lys
 65 70 75 80
 Ala Ala Gly Asn Ile Asn Ser Gly Tyr Lys Lys Pro Asn Pro Lys Asp
 85 90 95
 Tyr Asn Tyr Ser Gln Phe Tyr Trp Gly Gly Lys Tyr Asn Val Ser Val
 100 105 110
 Ser Ser Glu Ser Asn Asp Ala Val Asn Val Val Asp Tyr Ala Pro Lys
 115 120 125
 Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln Gln Thr Leu Gly Tyr Ser Tyr
 130 135 140
 Gly Gly Asp Ile Asn Ile Ser Asn Gly Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly
 145 150 155 160
 Ser Lys Ser Phe Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg
 165 170 175
 Thr Thr Ile Asp Arg Lys Thr Asn His Lys Ser Ile Gly Trp Gly Val
 180 185 190
 Glu Ala His Lys Ile Met Asn Asn Gly Trp Gly Pro Tyr Gly Arg Asp
 195 200 205
 Ser Tyr Asp Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu Phe Leu Gly Gly Arg Gln
 210 215 220
 Ser Ser Ser Asn Ala Gly Gln Asn Phe Leu Pro Thr His Gln Met Pro
 225 230 235 240
 Leu Leu Ala Arg Gly Asn Phe Asn Pro Glu Phe Ile Ser Val Leu Ser
 245 250 255
 His Lys Gln Asn Asp Thr Lys Lys Ser Lys Ile Lys Val Thr Tyr Gln
 260 265 270
 Arg Glu Met Asp Arg Tyr Thr Asn Gln Trp Asn Arg Leu His Trp Val
 275 280 285
 Gly Asn Asn Tyr Lys Asn Gln Asn Thr Val Thr Phe Thr Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Glu Val Asp Trp Gln Asn His Thr Val Lys Leu Ile Gly Thr Asp Ser
 305 310 315 320
 Lys Glu Thr Asn Pro Gly Val
 325

<210> 20

<211> 327

ES 2 684 088 T3

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 20

```

Met Lys Met Lys Lys Leu Val Lys Ser Ser Val Ala Ser Ser Ile Ala
 1          5          10          15

Leu Leu Leu Leu Ser Asn Thr Val Asp Ala Ala Gln His Ile Thr Pro
 20          25          30

Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
 35          40          45

Ala Thr Ser Asp Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
 50          55          60

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

Ala Ala Gly Asn Ile Asn Ser Gly Tyr Lys Lys Pro Asn Pro Lys Asp
 85          90          95

Tyr Asn Tyr Ser Gln Phe Tyr Trp Gly Gly Lys Tyr Asn Val Ser Val
 100         105         110

Ser Ser Glu Ser Asn Asp Ala Val Asn Val Val Asp Tyr Ala Pro Lys
 115         120         125

Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln Gln Thr Leu Gly Tyr Ser Tyr
 130         135         140

Gly Gly Asp Ile Asn Ile Ser Asn Gly Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly
 145         150         155         160

Ser Lys Ser Phe Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg
 165         170         175

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

Glu Ala His Lys Ile Met Asn Asn Gly Trp Gly Pro Tyr Gly Arg Asp
 195         200         205

```

ES 2 684 088 T3

Ser Tyr Asp Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu Phe Leu Gly Gly Arg Gln
 210 215 220

Ser Ser Ser Asn Ala Gly Gln Asn Phe Leu Pro Thr His Gln Met Pro
 225 230 235 240

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

His Lys Gln Asn Asp Thr Lys Lys Ser Lys Ile Lys Val Thr Tyr Gln
 260 265 270

Arg Glu Met Asp Arg Tyr Thr Asn Gln Trp Asn Arg Leu His Trp Ile
 275 280 285

Gly Asn Asn Tyr Lys Asn Gln Asn Thr Val Thr Phe Thr Ser Thr Tyr
 290 295 300

Glu Val Asp Trp Gln Asn His Thr Val Lys Leu Ile Gly Thr Asp Ser
 305 310 315 320

Lys Glu Thr Asn Pro Gly Val
 325

<210> 21

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<400> 21

Met Lys Met Lys Lys Leu Val Lys Ser Ser Val Ala Ser Ser Ile Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Asn Thr Val Asp Ala Ala Gln His Ile Thr Pro
 20 25 30

Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asp Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
 50 55 60

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

Ala Ala Gly Asn Ile Asn Ser Gly Tyr Lys Lys Pro Asn Pro Lys Asp
 85 90 95

ES 2 684 088 T3

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

<210> 22

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Staphylococcus aureus

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

ES 2 684 088 T3

<222> (288)..(288)

<223> Xaa puede ser Val o Ile

<400> 22

```

Met Lys Met Lys Lys Leu Val Lys Ser Ser Val Ala Ser Ser Ile Ala
1          5          10          15

Leu Leu Leu Leu Ser Asn Thr Val Asp Ala Ala Gln His Ile Thr Pro
20          25          30

Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile Thr Leu Tyr Lys Thr Thr
35          40          45

Ala Thr Ser Asp Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ser Gln Ile Leu Thr Phe
50          55          60

Asn Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr Asp Lys Asp Thr Leu Val Leu Lys
65          70          75

Ala Ala Gly Asn Ile Asn Ser Gly Tyr Lys Lys Pro Asn Pro Lys Asp
85          90          95

Tyr Asn Tyr Ser Gln Phe Tyr Trp Gly Gly Lys Tyr Asn Val Ser Val
100         105         110

Ser Ser Glu Ser Asn Asp Ala Val Asn Val Val Asp Tyr Ala Pro Lys
115         120         125

Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln Gln Thr Leu Gly Tyr Ser Tyr
130         135         140

Gly Gly Asp Ile Asn Ile Ser Asn Gly Leu Ser Gly Gly Leu Asn Gly
145         150         155         160

Ser Lys Ser Phe Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Lys Gln Glu Ser Tyr Arg
165         170         175

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

Glu Ala His Lys Ile Met Asn Asn Gly Trp Gly Pro Tyr Gly Arg Asp
195         200         205

```

ES 2 684 088 T3

Ser Tyr Asp Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu Phe Leu Gly Gly Arg Gln
 210 215 220

Ser Ser Ser Asn Ala Gly Gln Asn Phe Leu Pro Thr His Gln Met Pro
 225 230 235 240

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

His Lys Gln Asn Asp Thr Lys Lys Ser Lys Ile Lys Val Thr Tyr Gln
 260 265 270

Arg Glu Met Asp Arg Tyr Thr Asn Gln Trp Asn Arg Leu His Trp Xaa
 275 280 285

Gly Asn Asn Tyr Lys Asn Gln Asn Thr Val Thr Phe Thr Ser Thr Tyr
 290 295 300

Glu Val Asp Trp Gln Asn His Thr Val Lys Leu Ile Gly Thr Asp Ser
 305 310 315 320

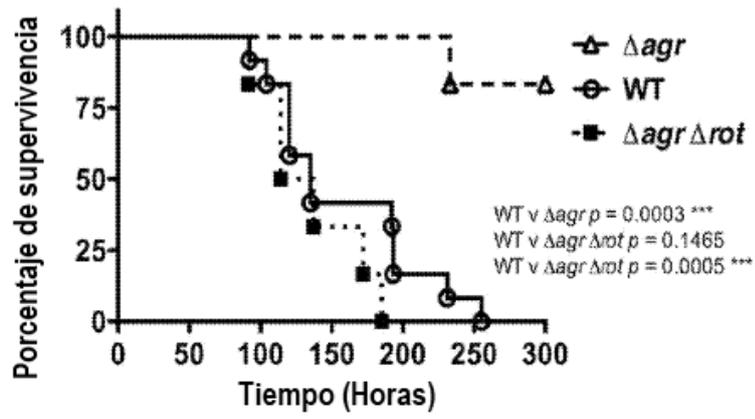
Lys Glu Thr Asn Pro Gly Val
 325

REIVINDICACIONES

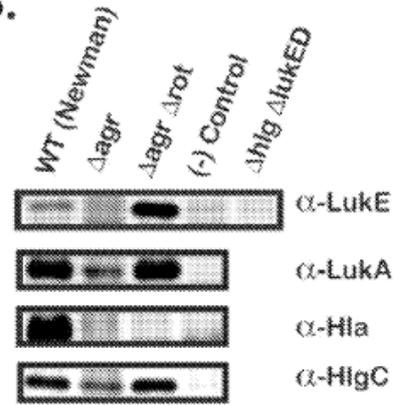
1. Una composición que comprende:

- 5 una cantidad terapéuticamente eficaz de (i) un polipéptido LukE aislado que tiene una longitud de 200-300 aminoácidos y comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 48-291 de la SEQ ID NO:11, (ii) un polipéptido LukD aislado que tiene una longitud de 250-300 aminoácidos y comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 46-307 de la SEQ ID NO:22, o (iii) una combinación de los mismos, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que la proteína o polipéptido aislado de la misma de la composición está unida a una molécula portadora inmunogénica.
- 15 3. La composición de la reivindicación 2, en la que la molécula portadora inmunogénica se une covalente o no covalentemente al polipéptido aislado.
4. La composición de la reivindicación 2, en la que la molécula portadora inmunogénica se selecciona del grupo que consiste en albúmina de suero bovino, ovoalbúmina de huevo de gallina, hemocianina de lapa californiana, toxoide tetánico, toxoide diftérico, tiroglobulina, un polisacárido capsular neumocócico, CRM 197 y una proteína de membrana externa meningocócica.
- 20 5. La composición de la reivindicación 1, que comprende además uno o más antígenos de *S. aureus* adicionales seleccionados del grupo que consiste en un antígeno de hemolisina alfa, proteína A, un antígeno de polisacárido de serotipo 336, coagulasa, factor de aglutinación A, factor de aglutinación B, una proteína de unión a la fibronectina, una proteína de unión al fibrinógeno, una proteína de unión al colágeno, una proteína de unión a elastina, una proteína análoga del MHC, una adhesión intracelular de polisacáridos, hemolisina beta, hemolisina delta, hemolisina gamma, leucocidina Pantón-Valentine, leucocidina A, leucocidina B, leucocidina M, toxina exfoliativa A, toxina exfoliativa B, proteasa V8, hialuronato liasa, lipasa, estafiloquinasa, una enterotoxina, toxina-1 del síndrome de choque tóxico, poli-N-succinil beta-1" 6 glucosamina, catalasa, beta-lactamasa, ácido teicoico, peptidoglicano, una proteína de unión a penicilina, proteína inhibidora de quimiotaxis, inhibidor de complemento, Sbi, antígeno de Tipo 5, antígeno de Tipo 8, ácido lipoteicoico y componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas huésped.
- 25 6. La composición de la reivindicación 1 que comprende además un adyuvante.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que consiste en flagelina, adyuvante completo o incompleto de Freund, hidróxido de aluminio, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsión oleosa, dinitrofenol, iscomatriz y partículas de ADN de policación liposómico.
- 30 8. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido LukE aislado tiene una longitud de 250-300 aminoácidos y comprende una secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 29-301 de la SEQ ID NO:11, residuos de aminoácidos 29-311 de la SEQ ID NO: 11, o los residuos de aminoácidos 48-301 de SEQ ID NO: 11.
- 35 9. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido LukD aislado tiene una longitud de 250-300 aminoácidos y comprende una secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 27-312 de la SEQ ID NO:22, residuos de aminoácidos 27-327 de la SEQ ID NO:22, o los residuos de aminoácidos 46-312 de SEQ ID NO:22.

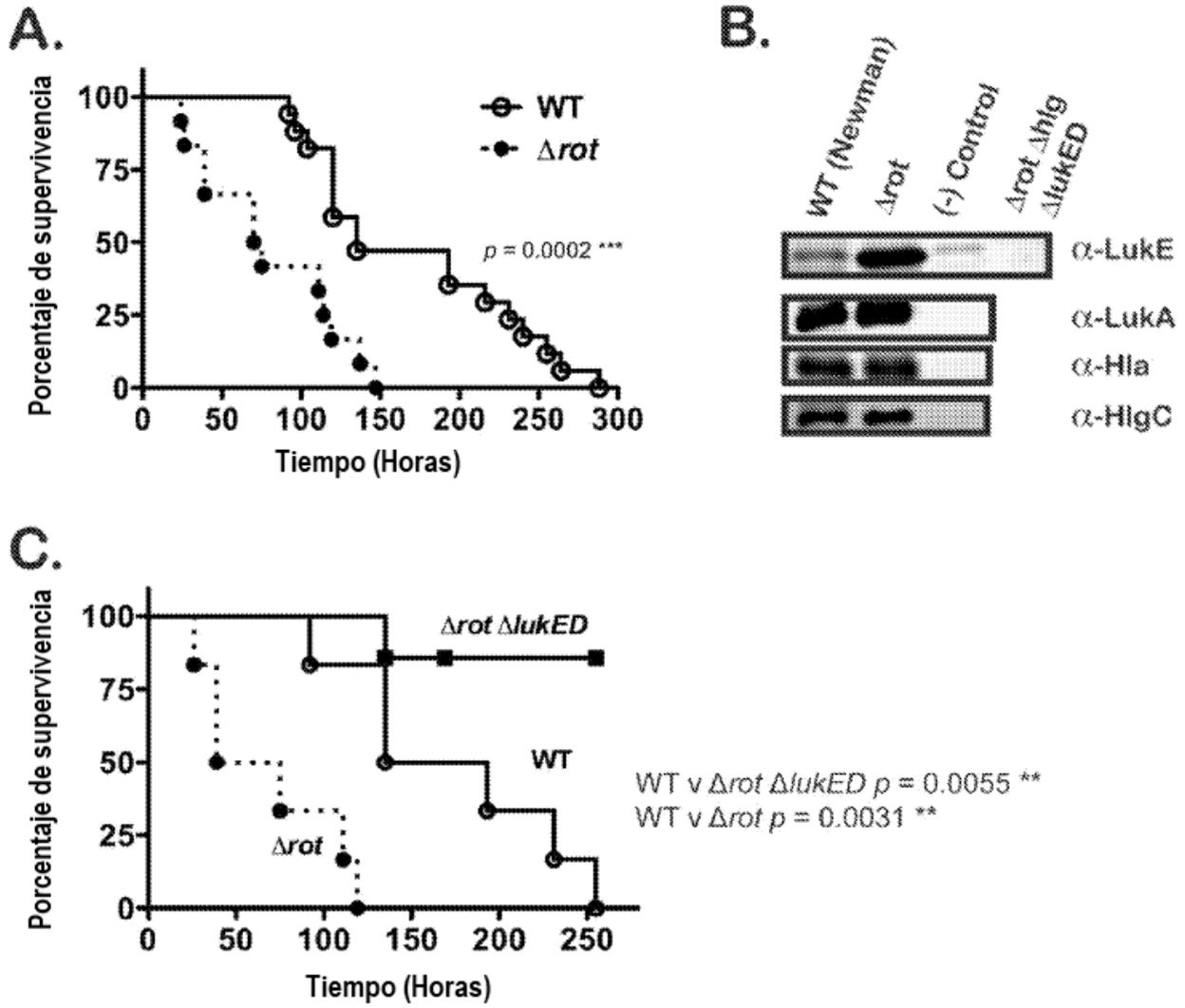
A.



B.

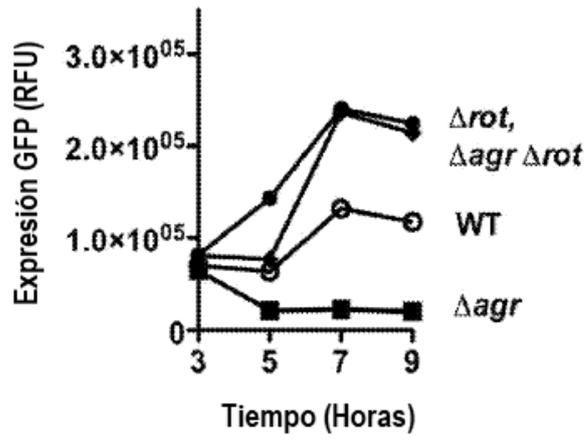


FIGURAS 1A-1B

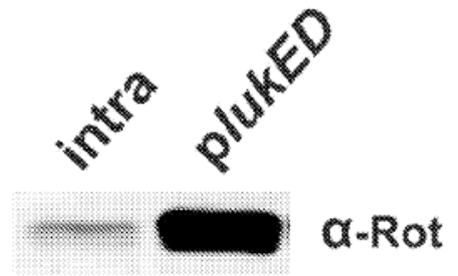


FIGURAS 2A-2C

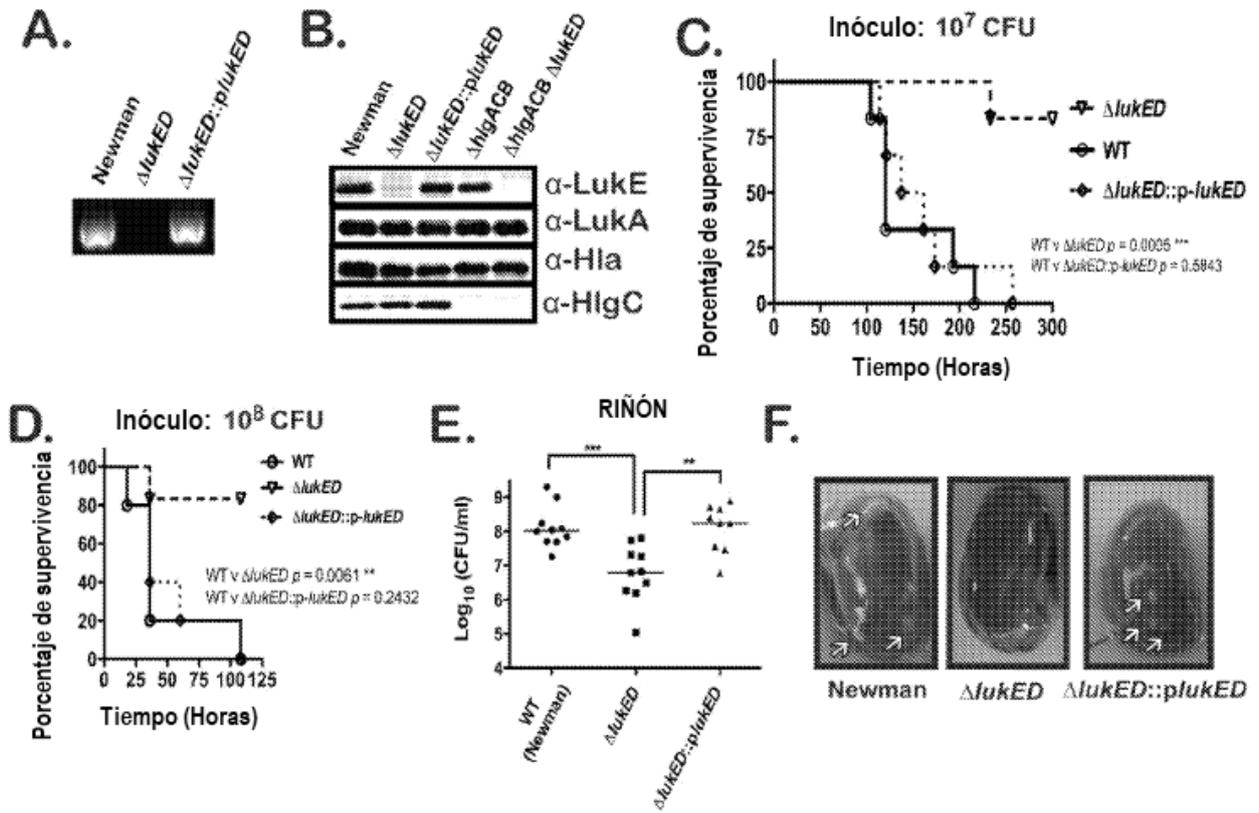
A.



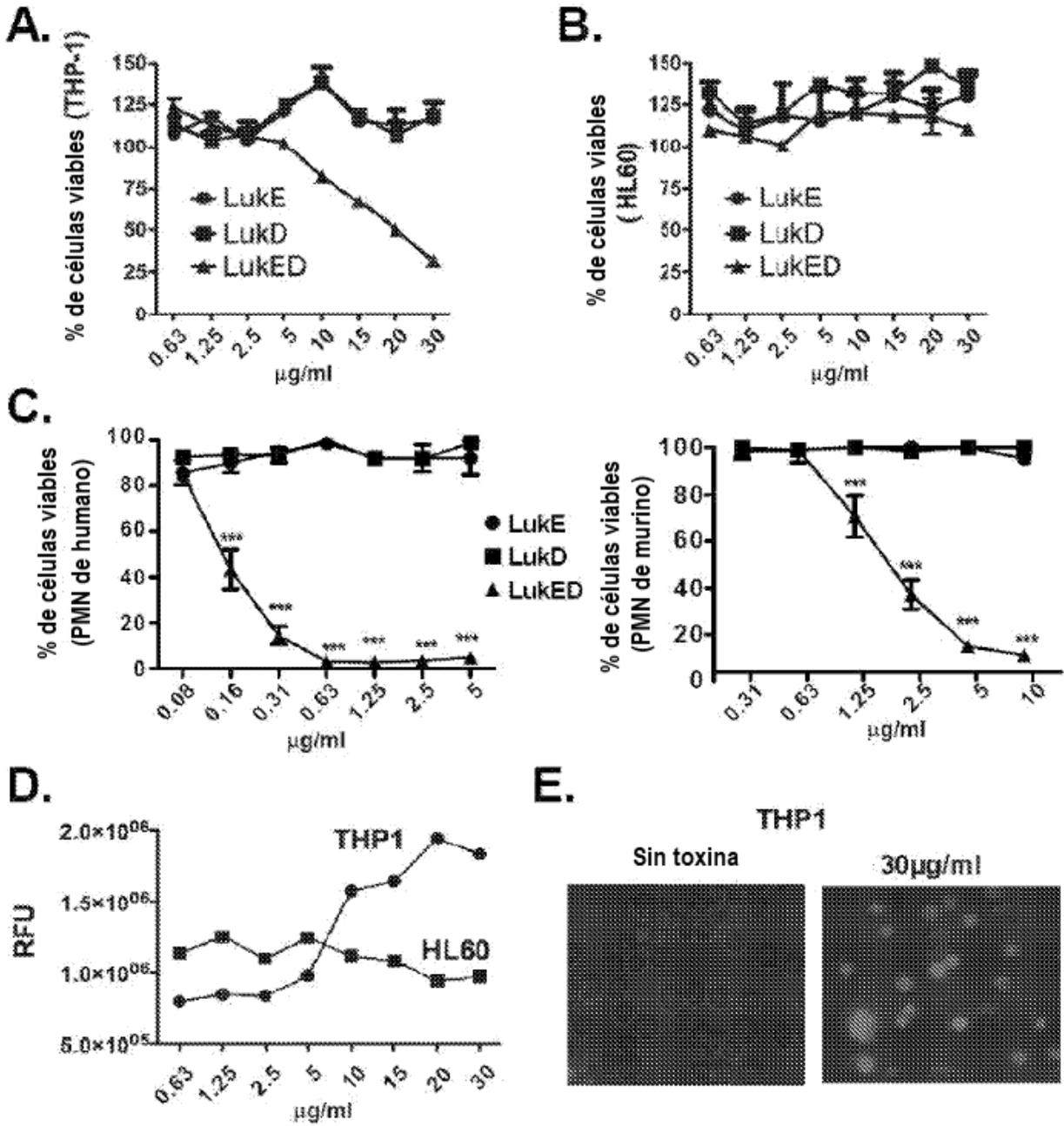
B.



FIGURAS 3A-3B

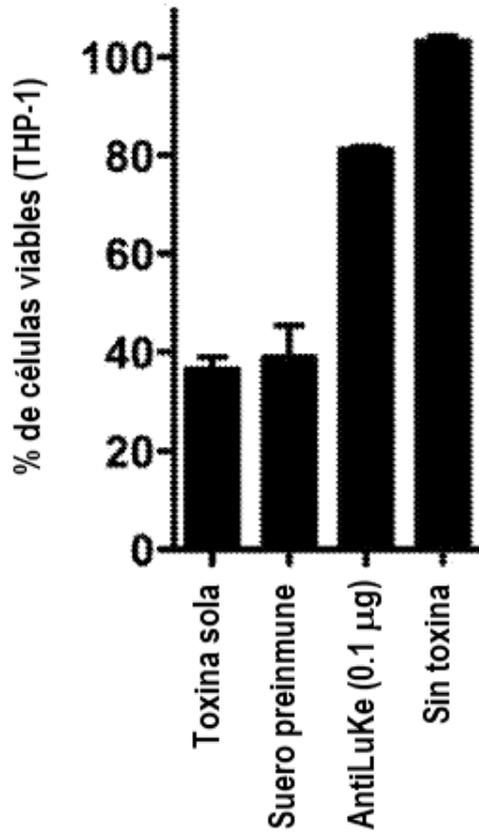


FIGURAS 4A-4F

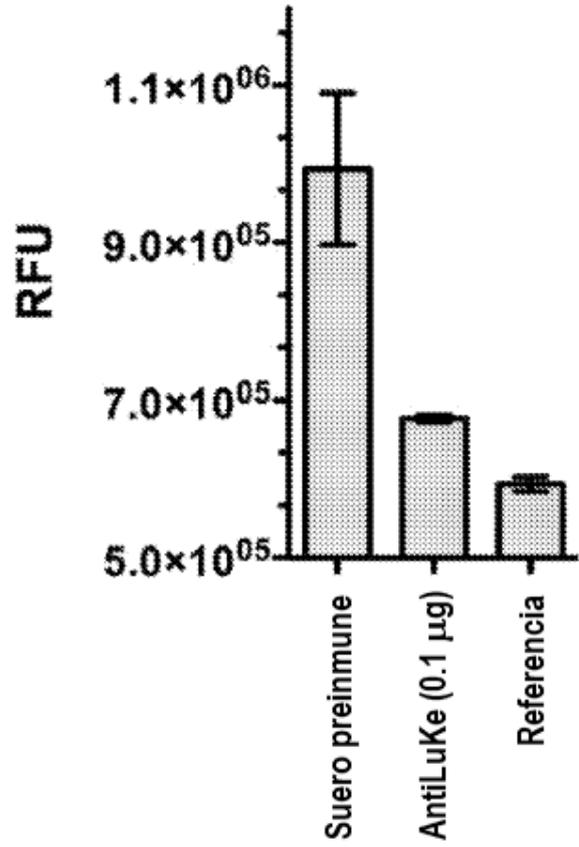


FIGURAS 5A-5E

A.



B.



FIGURAS 6A-6B