

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 527**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/04** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61K 31/255** (2006.01)

**A61K 31/44** (2006.01)

**A61K 31/505** (2006.01)

**A61K 31/341** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2014** **E 18193473 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020** **EP 3441474**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que contienen una leucocidina E mutada**

30 Prioridad:

**18.06.2013 US 201361836516 P**

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

**12.03.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**REYES-ROBLES, TANARA;  
ALONZO, FRANCIS y  
TORRES, VICTOR J.**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 811 527 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

Composiciones farmacéuticas que contienen una leucocidina E mutada

## 5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a métodos para tratar y prevenir infecciones por *Staphylococcus aureus*, y a métodos para identificar agentes terapéuticos novedosos para el tratamiento y prevención de infecciones por *Staphylococcus aureus*.

## 10 Antecedentes de la invención

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es una bacteria que coloniza proporcionalmente más del 25% de la población humana. Al obtener acceso al torrente sanguíneo, *S. aureus* se disemina dando como resultado una amplia gama de enfermedades. *S. aureus* es la principal causa de infecciones nosocomiales, es el agente etiológico más común de endocarditis infecciosa, así como infecciones de piel y tejidos blandos, y es una de las cuatro causas principales de enfermedades transmitidas por alimentos. En total, se estima que *S. aureus* infecta a más de 1,2 millones de pacientes por año en hospitales de Estados Unidos. La amenaza de *S. aureus* para la salud humana se destaca aún más por la aparición de cepas resistentes a los antibióticos (es decir, cepas MRSA), incluidas las cepas resistentes a la vancomicina, un antibiótico considerado la última línea de defensa contra la infección por *S. aureus*. Estos hechos destacan la importancia de desarrollar agentes terapéuticos novedosos contra este importante patógeno.

El éxito de *S. aureus* como patógeno humano se debe en parte a la capacidad de esta bacteria para desarmar el sistema inmune del huésped al producir un arsenal de factores de virulencia que se secretan en el medio extracelular (Foster, T.J. "Immune Evasion by Staphylococci", *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 948-58 (2005)). Entre estos, las leucotoxinas bicomponentes, formadoras de poros son de particular interés porque atacan y matan una variedad de células inmunes involucradas en el control de infecciones ("*Staphylococcus aureus* Hemolysins, Bi-Component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors?" *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:12 (2012); Alonzo & Torres, "Bacterial Survival Amidst an Immune Onslaught: The Contribution of the *Staphylococcus aureus* Leukotoxins. *PLoS Pathog.* 9:e1003143 (2013)). Entre estas células inmunes, las leucotoxinas matan las células polimorfonucleares también conocidas como "PMN", que actúan como la barrera inicial contra la infección mediante la muerte fagocítica del microorganismo intruso (Rigby & DeLeo, "Neutrophils in Innate Host Defense Against *Staphylococcus aureus* Infections", *Semin. Immunopathol.* 34: 237-59 (2012)).

Cada leucotoxina está compuesta por dos subunidades, el tipo "S" y "F", que actúan en concierto para formar poros octaméricos en las membranas de las células objetivo (Yamashita et al., "Crystal Structure of the Octameric Pore of Staphylococcal Gamma-Hemolysin Reveals the Beta-Barrel Pore Formation Mechanism by Two Components", *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 108: 17314-9 (2011)), que finalmente conduce a la muerte celular. Las cepas clínicamente relevantes de *S. aureus* pueden producir hasta cinco leucotoxinas bicomponentes diferentes: leucocidina de Pantone-Valentine (PVL o LukFS-PV), leucocidina E/D (LukED),  $\gamma$ -hemolisina (HlgAB y HlgCB) y leucocidina A/B (LukAB; también conocida como LukGH) (Vandenesch et al., "*Staphylococcus aureus* Hemolysins, Bi-Component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors?" *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:12 (2012); Alonzo & Torres, "Bacterial Survival Amidst an Immune Onslaught: The Contribution of the *Staphylococcus aureus* Leukotoxins. *PLoS Pathog.* 9:e1003143 (2013)). Estas toxinas son capaces de atacar y matar PMN humanas, pero también exhiben tropismo hacia leucocitos adicionales (Alonzo & Torres, "Bacterial Survival Amidst an Immune Onslaught: The Contribution of the *Staphylococcus aureus* Leukotoxins. *PLoS Pathog.* 9: e1003143 (2013); Gravel et al., "Characterization of a Novel Structural Member, LukE-LukD, of the Bi-Component Staphylococcal Leucotoxins Family", *FEBS Lett.* 436:202-8 (1998); Morinaga et al., "Purification, Cloning and Characterization of Variant LukE-LukD With Strong Leukocidal Activity of Staphylococcal Bi-Component Leukotoxin Family", *Microbiol. Immunol.* 47: 81-90 (2003); Perret et al., "Cross-Talk Between *Staphylococcus aureus* Leukocidins-Intoxicated Macrophages and Lung Epithelial Cells Triggers Chemokine Secretion in an Inflammation-Dependent Manner", *Cell. Microbiol.* 14: 1019-36 (2012)), lo que sugiere que *S. aureus* usa leucotoxinas para agotar las células inmunes responsables de proteger al cuerpo de la infección. Además de los leucocitos, HlgAB, HlgCB y LukED también pueden lisar los glóbulos rojos (RBC) (Morinaga et al., "Purification, Cloning and Characterization of Variant LukE-LukD With Strong Leukocidal Activity of Staphylococcal Bi-Component Leukotoxin Family", *Microbiol. Immunol.* 47:81-90 (2003)), que podría contribuir al crecimiento de *S. aureus in vivo* mediante la liberación de hemoglobina de RBC para su uso como fuente de hierro (Torres et al., "*Staphylococcus aureus* Fur Regulates the Expression of Virulence Factors That Contribute to the Pathogenesis of Pneumonia", *Infect. Immun.* 78:1618-28 (2010)).

A pesar de más de cien años de investigación sobre la actividad citotóxica de las leucotoxinas de *S. aureus*, los receptores celulares que dictan el tropismo de las leucotoxinas a las células inmunes y los glóbulos rojos permanecen incompletamente definidos.

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

## 65 Sumario de la invención

La presente invención se dirige a una composición que comprende una proteína de leucocidina E (LukE) aislada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, o un polipéptido de la misma, que tiene un dominio de unión a CXCR1/CXCR2 no funcional, en el que uno o más residuos de aminoácidos 182-196 de la SEQ ID NO: 4 se sustituyen o se eliminan; y un portador farmacéuticamente aceptable.

*S. aureus* infecta a más de 1,2 millones de pacientes por año en hospitales de los Estados Unidos, con alrededor de 40.000 muertes por año en los Estados Unidos. Esta bacteria es la principal causa de infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad; es el agente etiológico más común de las infecciones por endocarditis infecciosa, infecciones de la piel y tejidos blandos; y es una de las cuatro causas principales de enfermedades transmitidas por alimentos. La amenaza de *S. aureus* para la salud humana se ve agravada por la aparición de cepas resistentes a los antibióticos, incluido *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA). Estos hechos resaltan la importancia de identificar nuevos objetivos para el desarrollo de agentes terapéuticos novedosos. La presente invención se refiere al descubrimiento de que CXCR1, CXCR2 y DARC son receptores celulares humanos para los factores de virulencia de *S. aureus*, leucocidina ED (LukED) y  $\gamma$ -hemolisina AB (HlgAB). Esta información tiene enormes implicaciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus*. CXCR1/CXCR2 se encuentran principalmente en la superficie de las PMN, que son los primeros respondedores involucrados en el control de las infecciones por *S. aureus*. La importancia de las PMN para evitar las infecciones por *S. aureus* queda mejor demostrada por la observación de que los humanos que albergan defectos genéticos en las funciones de PMN son altamente susceptibles a las infecciones por *S. aureus* (Rigby & DeLeo, "Neutrophils in Innate Host Defense Against *Staphylococcus aureus* Infections", Semin. Immunopathol. 34: 237-59 (2012)). Las composiciones para bloquear la interacción de LukED y HlgAB con CXCR1/CXCR2 de la presente invención evitarán la muerte de estas células mediada por LukED y HlgAB, lo que a su vez aumentará la capacidad del sistema inmunitario del huésped para combatir la infección por *S. aureus*. Además, CXCR1, CXCR2 y DARC también se encuentran en la superficie del endotelio, y es probable que la lesión de las células endoteliales mediada por LukED y HlgAB facilite la permeabilidad endovascular que resulta en choque séptico, un resultado común de la infección del torrente sanguíneo por *S. aureus* que termina en sepsis. Por lo tanto, el bloqueo de los efectos mediados por LukED y HlgAB sobre las células endoteliales usando las composiciones de la presente invención también facilitará el tratamiento y la prevención de la infección por *S. aureus*.

#### Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1G demuestran que LukED ataca a CXCR1 y CXCR2 para matar monocitos y PMN. En la Figura 1A, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de un donante  $\Delta 32Ccr5$  se incubaron con PBS o LukED (75 nM) y se seleccionaron por la positividad de CD14 y CD3. La Figura 1B muestra la viabilidad de neutrófilos humanos primarios (PMN) aislados de un donante Ccr5<sup>+</sup> o un donante  $\Delta 32Ccr5$  en presencia de LukE, LukD o LukED (75 nM). La Figura 1C muestra la carga bacteriana (UFC) de hígados de ratones Ccr5<sup>+/+</sup> infectados por vía sistémica con *S. aureus* isogénico de tipo silvestre (N = 14), cepas  $\Delta LukED$  (N = 15) o  $\Delta LukED::LukED$  (N = 15) y ratones Ccr5<sup>-/-</sup> infectados sistémicamente con *S. aureus* de tipo silvestre (N = 10) o  $\Delta LukED$  (N = 11). La Figura 1D es un gráfico que muestra la viabilidad de las células HEK293T transfectadas con los receptores de quimiocinas indicados e incubadas con LukED o LukSF-PV (600 nM). Las Figuras 1E-1F muestran los niveles de CXCR1 y CXCR2 en la superficie de PMN (Figura 1E) o monocitos (Figura 1F) según lo determinado por citometría de flujo. La Figura 1G muestra la viabilidad de las células THP-1 transducidas con ARNph no objetivo o Cxcr2 tratados con LukED. \* P < 0,05 por análisis de varianza unidireccional (Figura 1C). Se muestran las medias  $\pm$  SEM (n = 3).

La Figura 2 muestra que Maraviroc (MVC) no protege a los monocitos de la muerte mediada por LukED. Células CD14<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup> presentes en PBMC seleccionadas por CCR5<sup>+</sup> tratadas con PBS (sin toxina), LukED (75 nM) o LukED (75 nM) más MVC (100 ng/mL).

La Figura 3 demuestra que LukED se dirige a CCR5, CXCR1, CXCR2 y DARC para matar las células huésped. Las células HEK293T se transfectaron con plásmido vacío (pcADN), o con plásmidos que contenían ADNc que codifican los receptores de quimiocinas indicados. Luego, las células se expusieron a LukED durante 1 hora y los poros mediados por toxinas se midieron por la permeabilidad al bromuro de etidio.

Las Figuras 4A-4B muestran que HlgAB usa CXCR1, CXCR2 y DARC para atacar y matar células de mamíferos. Las células HEK293T se transfectaron con plásmidos que contenían el ADNc que codifica los receptores de quimiocinas indicados. Las células se expusieron luego a 20  $\mu$ g/mL de HlgAB (Figura 4A) o HlgCB (Figura 4B) como se indica y los poros mediados por toxinas se midieron por la permeabilidad al bromuro de etidio.

Las Figuras 5A-5C muestran los niveles en la superficie de varios receptores de quimiocinas probados en células HEK293T y THP-1 transfectadas transitoriamente. La Figura 5A muestra los niveles en la superficie de CCR5, CXCR1, CXCR2 y CXCR4 en células HEK293T transfectadas transitoriamente, según lo evaluado por citometría de flujo. La Figura 5B muestra los niveles en la superficie de CXCR1 y CXCR2 en las células THP-1 según lo evaluado por citometría de flujo. La Figura 5C muestra los niveles de CXCR2 en células THP-1 transducidas con ARNph Cxcr2 según lo determinado por citometría de flujo.

Las Figuras 6A-6E demuestran que LukED se dirige a los PMN mediante la unión de LukE a CXCR1 y CXCR2. La Figura 6A muestra la unión de GFP-LukE o GFP-LukD a la superficie de los PMN evaluados por citometría de flujo. La Figura 6B muestra la unión de GFP-LukE (300 nM) a PMN en presencia de LukE o LukS-PV sin marcar como se determina por citometría de flujo. La Figura 6C muestra la viabilidad de PMN desafiados con una dosis letal de LukED (75 nM) en presencia de CXCL8 o CXCL1. La Figura 6D muestra la unión de GFP-LukE (300 nM) a la superficie de PMN en presencia de CXCL8. La Figura 6E son inmunotransferencias que muestran la interacción de His-LukE o His-LukD con lisados celulares que contienen CXCR1 o CXCR2 etiquetados con HA. Las inmunotransferencias son

representativas de al menos tres experimentos independientes. Se muestran las medias  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

La Figura 7 muestra que LukE no activa la señalización de calcio en PMN. El gráfico muestra la movilización de calcio en PMN tras la adición de LukE (300 nM), CXCL8 (0,3 nM) o CXCL1 (0,3 nM), medido por citometría de flujo.

La Figura 8 es un alineamiento de secuencia de aminoácidos de LukE y LukS-PV. Los aminoácidos conservados se representan en rojo (los residuos de aminoácidos no conservados se indican con una X). Las regiones de divergencia ("DR") del dominio de Rim se indican de la siguiente manera: DR1 (cuadro amarillo), DR2 (cuadro gris), DR3 (cuadro naranja), DR4 (cuadro azul) y DR5 (cuadro rojo). La alineación se generó con el software MegAlign de ADNSTAR utilizando el método ClustalW.

Las Figuras 9A-9H demuestran que los residuos de aminoácidos 182-196 de LukE en la Región 4 de divergencia son necesarios para el ataque de LukED a las células CXCR1 y CXCR2+. La Figura 9A muestra que las estructuras de LukE y LukS-PV difieren principalmente en la superficie del dominio de Rim, como lo indica una rampa de color en la que los residuos altamente divergentes se colorean en azul oscuro, los residuos idénticos se colorean en rojo y las sustituciones conservadoras tienen un color intermedio. La Figura 9B es una alineación estructural de LukE (3ROH, azul claro) y LukS (1T5R, verde claro) con DR de 1-5 aminoácidos resaltados de la siguiente manera: DR1 (amarillo, 57-75), DR2 (gris, 139-150), DR3 (anaranjado, 164-178), DR4 (azul, 182-196) y DR5 (rojo, 237-271). La Figura 9C muestra la viabilidad de los PMN tratados con híbridos de tipo silvestre y LukE<sup>DR</sup> (DR 1-5, 300 nM). El inserto es un gel teñido de azul de Coomassie de híbridos LukE<sup>DR</sup> purificados. La Figura 9D muestra la viabilidad de las células CCR5+ tratadas con las toxinas indicadas (300 nM). La Figura 9E muestra la unión de GFP-LukE (300 nM) en presencia de LukE o LukE<sup>DR4</sup> sin marcar como se determina por citometría de flujo. La Figura 9F representa la estructura de LukE<sup>DR4</sup> (azul) con residuos que difieren entre LukE y LukS-PV mostrados como barras. Los gráficos de las Figuras 9G y 9H muestran infección *ex vivo* de PMN (Figura 9G) o HUT-R5 (Figura 9H) con las cepas de *S. aureus* indicadas en una multiplicidad de infección de 10. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,0001$  mediante análisis de varianza unidireccional (d, g). Se muestran las medias  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ).

La Figura 10 muestra los efectos *ex vivo* e *in vivo* de LukED y LukE<sup>DR4D</sup>. La susceptibilidad de los subconjuntos de PBMC al tratamiento sin toxina (PBS), se evaluó LukED o LukE<sup>DR4D</sup> mediante citometría de flujo.

Las Figuras 11A-11B muestran un análisis de proteínas de diferentes cepas de *S. aureus*. La inmunotransferencia superior de la Figura 11A muestra un perfil de exoproteína de cepas de *S. aureus* sin toxinas complementadas con plásmidos que codifican *lukED* o *lukE<sup>DR4D</sup>*. Las dos inmunotransferencias inferiores de la Figura 11A evalúan los niveles de LukD, LukE, LukE<sup>DR4</sup> y la presencia de una etiqueta His en los constructos de LukE. La Figura 11B muestra los niveles de LukE, LukE<sup>DR4</sup> y LukD en cepas de integración de  $\Delta$ LukED de *S. aureus* o cepas complementadas con plásmidos que codifican *lukED* o *lukE<sup>DR4D</sup>* según lo evaluado por inmunotransferencia. Como control negativo, se usó una cepa que carecía de *lukED* y *hlgACB* ( $\Delta$ LukED  $\Delta$ hlgACB). Los niveles de LukE<sup>DR4</sup> producidos por *lukE<sup>DR4D</sup>* parecen estar reducidos en comparación con los niveles de LukE producidos por *lukED*. Sin embargo, se observan niveles comparables de LukE y LukE<sup>DR4</sup> mediante tinción de gel con azul de Coomassie en la inmunotransferencia de la Figura 11A, lo que indica que las reducciones aparentes en el nivel de proteína se deben al reconocimiento de anticuerpos subóptimos de LukE<sup>DR4</sup> en comparación con LukE.

Las Figuras 12A-12C muestran que la muerte mediada por LukED de las células CXCR1+ y CXCR2+ contribuye a la patogénesis de *S. aureus* en modelos de infección sistémica en ratones. La Figura 12A muestra la viabilidad de los PMN murinos provocados peritoneales (CXCR2+) o macrófagos (CCR5+) en presencia de PBS (sin toxina), LukED o LukE<sup>DR4D</sup> (300 nM). La Figura 12B muestra la muerte celular en PMN murinos aislados del hígado (panel superior) y los riñones (panel inferior) de ratones infectados sistémicamente con cepas isogénicas de  $\Delta$ LukED,  $\Delta$ LukED::*LukED* o  $\Delta$ LukED::*LukE<sup>DR4D</sup>* de *S. aureus*. La Figura 12C muestra la 'supervivencia' de ratones infectados con cepas isogénicas  $\Delta$ LukED ( $n = 10$ ),  $\Delta$ LukED::*LukED* (+*lukED*,  $n = 16$ ) o  $\Delta$ LukED::*LukE<sup>DR4D</sup>* (+*lukE<sup>DR4D</sup>*,  $n = 16$ ) de *S. aureus*. Los gráficos de FACS son representativos de uno de 3 ratones por tratamiento (Figura 12A) o uno de 10 ratones infectados por cepa (Figura 12B). Análisis estadístico para  $\Delta$ LukED v +*lukED*, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ;  $\Delta$ LukED v +*lukE<sup>DR4D</sup>*,  $p = 0,0577$ ; +*lukED* v +*lukE<sup>DR4D</sup>*, \*\*\*  $p < 0,0003$  mediante análisis de varianza unidireccional (prueba de Mantel-Cox) (Figura 12C).

Las Figuras 13A-13B muestran los efectos *ex vivo* e *in vivo* de LukED y LukE<sup>DR4D</sup>. La Figura 13A muestra la viabilidad de los PMN o macrófagos aislados de PEC murinos tras el tratamiento con PBS (sin toxina), LukED o LukE<sup>DR4D</sup>. La Figura 13B muestra la viabilidad de los PMN aislados del hígado o los riñones de ratones infectados con  $\Delta$ LukED,  $\Delta$ LukED::*LukED* o  $\Delta$ LukED::*LukE<sup>DR4D</sup>* isogénico de *S. aureus*.

La Figura 14 demuestra que los residuos de aminoácidos de HlgA 180-192 en la Región de Divergencia 4 son necesarios para HlgAB dirigido a neutrófilos humanos (hPMN), células CXCR1/CXCR2+. Esta figura muestra la viabilidad de los hPMN tratados con toxinas híbridas de tipo silvestre y HlgA<sup>DR</sup>. La viabilidad celular se controló con el ensayo de proliferación celular CellTiter 96@ AQueous One Solution (Promega). Los resultados representan los media y SEM de diferentes donantes humanos ( $n = 8$ ).

Las Figuras 15A-15B demuestran que los aminoácidos P184, G186, P187 y G189 de LukE dentro del dominio DR4 son necesarios para el ataque de LukED a células CXCR1 y CXCR2+ y para la letalidad observada de LukED en ratones. La Figura 15A muestra la viabilidad de los hPMN tratados con LukED de tipo silvestre (LukE/LukD) o las toxinas LukE<sup>P184, G186, P187, G189</sup>/LukD. Los resultados representan los media y SEM de diferentes donantes humanos ( $n = 8$ ). La Figura 15B muestra la "supervivencia" de ratones tras la administración al torrente sanguíneo de 10  $\mu$ g de cada variante de LukE en combinación con 10  $\mu$ g de LukD. Los ratones ( $n = 5$ ) fueron tratados con una inyección intravenosa que contenía la toxina indicada y el tiempo de muerte registrado y presentado como un gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier.

Las Figuras 16A-16D demuestran que la lisis mediada por LukED de glóbulos rojos humanos (RBC) está asociada con la presencia de DARC y que la lisis mediada por LukED de RBC podría bloquearse con DARC purificado y un

anticuerpo anti-DARC. La Figura 16A muestra la susceptibilidad de los glóbulos rojos aislados de nueve donantes humanos independientes. La Figura 16B representa los datos presentados en la Figura 16A en la que los donantes se dividieron en DARC+ y DARC-. Los resultados representan la media y la SEM de diferentes donantes humanos (n = 5 para DARC+ y 4 para DARC-). La Figura 16C muestra que la lisis mediada por LukED de los glóbulos rojos se inhibe al aumentar las concentraciones de DARC purificado. Los resultados representan la media y SEM de diferentes donantes humanos (n = 3). La Figura 16D muestra que la lisis mediada por LukED de los glóbulos rojos se inhibe con un anticuerpo monoclonal anti-DARC IgG2A de ratón (clon # 358307). Los resultados representan la media y SEM de diferentes donantes humanos (n = 3). La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student.

## 10 Descripción detallada de la invención

Se describe un método para prevenir o tratar la infección por *Staphylococcus aureus* y/o una afección resultante de una infección por *S. aureus* en un sujeto. Este método implica seleccionar un sujeto que tenga o esté en riesgo de tener infección por *S. aureus* y administrar, al sujeto seleccionado, una composición que inhiba la interacción de *S. aureus* con CXCR1 y CXCR2 (es decir, inhibiendo la interacción de CXCR1/CXCR2 con LukE y/o HlgA), bajo condiciones efectivas para prevenir o tratar la infección por *S. aureus* y/o una condición resultante de una infección por *S. aureus* en el sujeto.

Hasta la fecha, la mayoría de las infecciones por *S. aureus* se deben a MRSA (Moran et al., "Methicillin-Resistant *S. aureus* Infections Among Patients in the Emergency Department", *The New England Journal of Medicine* 355:666-674 (2006)). Anteriormente, se pensaba que la mayoría de las infecciones por MRSA eran de origen nosocomial (HA-MRSA), sin embargo, ahora se producen infecciones en personas sanas que no han estado expuestas a centros de salud, es decir, MRSA asociado a la comunidad (CA-MRSA) (Klevens et al., "Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States", *Jama* 298: 1763-1771 (2007) and Klevens et al., "Changes in the Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Intensive Care Units in US Hospitals, 1992-2003", *Clin. Infect. Dis.* 42: 389-391 (2006)). Estas infecciones asociadas a CA-MRSA son más graves y dan como resultado tasas de mortalidad más altas en comparación con las infecciones por HA-MRSA (Deleo et al., "Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*", *Lancet* 375: 1557-1568 (2010)). Informes recientes han sugerido que el aumento de la virulencia de cepas asociadas con infecciones por CA-MRSA en comparación con las asociadas con infecciones por HA-MRSA se debe principalmente a la mayor capacidad de las cepas asociadas a CA-MRSA para evadir la muerte mediada por neutrófilos (PMN) (Voyich et al., "Insights into Mechanisms Used by *Staphylococcus aureus* to Avoid Destruction by Human Neutrophils", *J. Immunol.* 175: 3907-3919 (2005); Wang et al., "Identification of Novel Cytolytic Peptides as Key Virulence Determinants for Community-Associated MRSA", *Nat. Med.* 13: 1510-1514 (2007); Li et al., "Evolution of Virulence in Epidemic Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*", *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 106: 5883-5888 (2009); Dumont et al., "Characterization of a New Cytotoxin That Contributes to *Staphylococcus aureus* Pathogenesis", *Mol. Microbiol.* 79: 814-825 (2011); y Alonzo III et al., "Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth in Vivo", *Mol. Microbiol.* 83: 423-435 (2012)). *S. aureus* evita la muerte mediada por PMN al atacar y matar los PMN con una colección de citotoxinas y péptidos citolíticos (Wang et al., "Identification of Novel Cytolytic Peptides as Key Virulence Determinants for Community-Associated MRSA", *Nat. Med.* 13: 1510-1514 (2007); Dumont et al., "Characterization of a New Cytotoxin That Contributes to *Staphylococcus aureus* Pathogenesis", *Mol. Microbiol.* 79: 814-825 (2011); Alonzo III et al., "Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth in Vivo", *Mol. Microbiol.* 83: 423-435 (2012); Loffler et al., "Staphylococcus aureus Pantone-Valentine Leukocidin is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils", *PLoS Pathog.* 6: e1000715 (2010); y Ventura et al., "Identification of a Novel *Staphylococcus aureus* Two-Component Leukotoxin Using Cell Surface Proteomics", *PLoS One* 5: e11634 (2010)). Las cepas clínicamente relevantes de *S. aureus* pueden producir hasta cinco leucotoxinas bicomponentes diferentes: leucocidina de Pantone-Valentine (PVL o LukFS-PV), leucocidina E/D (LukED),  $\gamma$ -hemolisina (HlgAB y HlgCB) y leucocidina A/B (LukAB; también conocida como LukGH) (Vandenesch et al., "Staphylococcus aureus Hemolysins, Bi-Component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors?" *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2: 12 (2012), y Alonzo & Torres, "Bacterial Survival Amidst an Immune Onslaught: The Contribution of the *Staphylococcus aureus* Leukotoxins. *PLoS Pathog.* 9: e1003143 (2013)). Estas toxinas son cada una capaces de atacar y matar a los PMN humanos, pero también exhiben tropismo hacia leucocitos adicionales (Alonzo & Torres, "Bacterial Survival Amidst an Immune Onslaught: The Contribution of the *Staphylococcus aureus* Leukotoxins. *PLoS Pathog.* 9: e1003143 (2013); Gravet et al., "Characterization of a Novel Structural Member, LukE-LukD, of the Bi-Component Staphylococcal Leukotoxins Family", *FEBS Lett.* 436: 202-8 (1998); Morinaga et al., "Purification, Cloning and Characterization of Variant LukE-LukD With Strong Leukocidal Activity of Staphylococcal Bi-Component Leukotoxin Family", *Microbiol. Immunol.* 47: 81-90 (2003); Perret et al., "Cross-Talk Between *Staphylococcus aureus* Leukocidins-Intoxicated Macrophages and Lung Epithelial Cells Triggers Chemokine Secretion in an Inflammasome-Dependent Manner", *Cell. Microbiol.* 14: 1019-36 (2012)), lo que sugiere que *S. aureus* usa leucotoxinas para agotar las células inmunes responsables de proteger al cuerpo de la infección. Además de los leucocitos, HlgAB, HlgCB y LukED también pueden lisar los glóbulos rojos (RBC) (Morinaga et al., "Purification, Cloning and Characterization of Variant LukE-LukD With Strong Leukocidal Activity of Staphylococcal Bi-Component Leukotoxin Family", *Microbiol. Immunol.* 47: 81-90 (2003)), que podría contribuir al crecimiento de *S. aureus in vivo* liberando hemoglobina de los glóbulos rojos para su uso como fuente de hierro (Torres et al., "Staphylococcus aureus Fur Regulates the Expression of Virulence Factors That Contribute to the Pathogenesis of Pneumonia", *Infect. Immun.* 78: 1618-28 (2010)).

Dado el gran número de individuos que contraen MRSA anualmente, es probable que una proporción sustancial de estas infecciones sea refractaria a los cursos tradicionales de tratamiento con antibióticos. Un enfoque innovador para tratar tales infecciones es inhibir los factores de virulencia de *S. aureus*, tales como LukED y HlgAB, que matan a los PMN, la célula inmune innata más crítica involucrada en la defensa contra la infección por *S. aureus* y lisan los glóbulos rojos (RBC), que proporcionan nutrientes críticos para el crecimiento bacteriano. Como se describe en este documento, los solicitantes han identificado CXCR1 y CXCR2, también conocidos como las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de interleucina 8, respectivamente, como los receptores celulares para LukED y HlgAB en PMN humanos. Además, los solicitantes han identificado el receptor de antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) como el receptor celular para LukED y HlgAB en los glóbulos rojos humanos. La unión de LukED y HlgAB a estos receptores celulares conduce a la oligomerización de leucotoxinas y a la formación de poros que conducen a la muerte celular. Por lo tanto, los agentes y composiciones que inhiben la interacción de LukED y HlgAB de *S. aureus* con CXCR1/CXCR2 y/o DARC son clínicamente útiles para bloquear la citotoxicidad de *S. aureus*, evitando a su vez el agotamiento de los PMN y promoviendo la eliminación natural de *S. aureus* por el sistema inmunitario innato.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención, una composición adecuada para inhibir la interacción de *S. aureus* con CXCR1 y CXCR2 comprende un agente que inhibe tanto CXCR1 como CXCR2 (denominado inhibidor o antagonista de CXCR1/CXCR2). Los agentes adecuados que inhiben tanto CXCR1 como CXCR2 incluyen proteínas inhibitoras y péptidos, anticuerpos y moléculas pequeñas que son bien conocidas en la técnica y se describen con más detalle a continuación.

Los inhibidores peptídicos adecuados de CXCR1/CXCR2 incluyen los derivados del ligando receptor de CXCR1 y CXCR2, el ligando 8 de quimiocina CXC (CXCL8; también conocido como interleucina 8) según lo descrito por Li et al "CXCL8(3-74)K11R/G31P Antagonizes Ligand Binding to the Neutrophil CXCR1 and CXCR2 Receptors and Cellular Responses to CXCL8/IL-8", Biochem. Biophys. Res. Comm. 293(3): 939-944 (2002); la patente de los Estados Unidos No 8.039.429 de Gordon y la patente de los Estados Unidos No 7.201.895 de Gordon et al.. Los ejemplos de inhibidores de péptidos derivados de CXCL8 incluyen, sin limitación, CXCL8<sub>(3-74)</sub> K11R/G31P que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 Como se muestra a continuación.

```

Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Arg Thr His Ser Thr Pro Phe His
1           5           10           15

Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Pro Pro His Cys
          20           25           30

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

Leu Asn Pro Lys Glu Lys Trp Val Gln Lys Val Val Gln Val Phe Val
          50           55           60

Lys Arg Ala Glu Lys Gln Asp Pro
65           70
    
```

Los análogos de CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P, tales como CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P/P32G que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 (que se muestran a continuación) y CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/T12S/H13F/G31P que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 (que se muestran a continuación) también son adecuados.

SEQ ID NO:2; CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/G31P/P32G

```

Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Arg Thr His Ser Thr Pro Phe His
1           5           10           15

Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Gly His Cys
          20           25           30

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

Leu Asn Pro Lys Glu Lys Trp Val Gln Lys Val Val Gln Val Phe Val
          50           55           60

Lys Arg Ala Glu Lys Gln Asp Pro
65           70
    
```

# ES 2 811 527 T3

## SEQ ID NO:3; CXCL8<sub>(3-74)</sub>K11R/T12S/H13F/G31P

```

Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Arg Ser Pro Ser Thr Pro Phe His
1           5           10           15
Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Pro Pro His Cys
          20           25           30
Glu Asn Ser Glu Ile Ile Val Lys Leu Thr Asn Gly Asn Glu Val Cys
          35           40           45
Leu Asn Pro Lys Glu Lys Trp Val Gln Lys Val Val Gln Val Phe Val
          50           55           60
Lys Arg Ala Glu Lys Gln Asp Pro
65           70

```

5 Otros péptidos derivados de CXCL8 que funcionan de manera similar como inhibidores de CXCR1/CXCR2 divulgados en la patente de Estados Unidos No. 8.039.429 de Gordon y la patente de Estados Unidos No. 7.201.895 de Gordon et al..

10 Otros inhibidores peptídicos adecuados de CXCR1/CXCR2 incluyen péptidos recombinantes que comprenden la secuencia del dominio de unión al receptor CXCR1/CXCR2 de *S. aureus*. Como se describe en este documento, los solicitantes han identificado las regiones de las toxinas LukE y HlgA de *S. aureus* que se unen a CXCR1 y CXCR2. En consecuencia, los péptidos que comprenden estos residuos de aminoácidos constituyen péptidos inhibidores de CXCR1/CXCR2 adecuados. Por lo tanto, un inhibidor peptídico adecuado de CXCR1/CXCR2 comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a los residuos de aminoácidos 182-196 de la proteína LukE soluble (cepa Newman de *S. aureus*; SEQ ID NO: 4, que se muestra a continuación).

```

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

```

15

## ES 2 811 527 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

5 Un inhibidor peptídico CXCR1/CXCR2 que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de QSPNGPTGSAREYFA (SEQ ID NO: 5; es decir, los residuos 182-196 de la SEQ ID NO: 4), puede contener residuos de aminoácidos adicionales en su terminal N o C que no alteran su capacidad de unirse a CXCR1 o CXCR2, pero que funciona para mejorar la estabilidad o la administración objetivo del péptido inhibidor.

10 Un inhibidor peptídico adecuado de CXCR1/CXCR2 comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos de aminoácidos 180-192 de la proteína HlgA soluble (cepa Newman de *S. aureus*; SEQ ID NO: 6, que se muestra a continuación).

```

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

Thr Gln Asp Ile Thr Ser Lys Arg Leu Ala Ile Thr Gln Asn Ile Gln
      20                               25                       30

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

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

Lys Tyr Pro Tyr Ile Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile

```

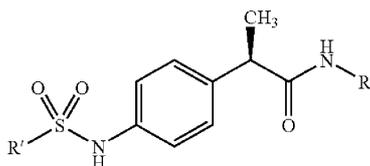
# ES 2 811 527 T3

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

5 Un inhibidor peptídico CXCR1/CXCR2 que comprende al menos la secuencia de aminoácidos de QDPTGPAARDYFV (SEQ ID NO: 7; es decir, los residuos 180-192 de la SEQ ID NO: 6), puede contener residuos de aminoácidos adicionales en su terminal N o C que no alteran su capacidad de unirse a CXCR1 o CXCR2, pero que funciona para mejorar la estabilidad o la administración objetivo del péptido inhibidor.

10 Las composiciones pueden comprender alternativamente una molécula pequeña que inhibe tanto CXCR1 como CXCR2. Se conocen numerosos inhibidores o antagonistas de moléculas pequeñas de CXCR1/CXCR2 en la técnica y son adecuados para su uso en estos métodos.

15 Una primera clase de ejemplos de inhibidores de CXCR1/CXCR2 de molécula pequeña adecuados para usar en estos métodos incluye (2R)-2-fenilpropanamidas que portan un sustituyente 4-sulfonilamino en la posición cuatro del grupo fenilo (véanse las patentes de los Estados Unidos. Nos. 7,652,169 y 7,868,046 de Allegretti et al., (Dompe SPA)). Esta clase de compuestos tiene una fórmula general de Fórmula I a continuación:



(I)

20 en la que

R de Fórmula I se selecciona de

H, OH, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> y fenilo;

un grupo heteroarilo seleccionado de pirrol, tiofeno, furano, indol, imidazol, tiazol, oxazol, piridina y pirimidina sustituido y no sustituido;

un residuo de fórmula  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O})_n\text{R}''$ , en la que  $\text{R}''$  es H o alquilo  $\text{C}_1-\text{C}_5$ , n es un número entero de 0 a 2;

o  $\text{R}'$  de Fórmula I, junto con el grupo NH al cual está acoplado, es un grupo radical de amidas primarias de aminoácidos naturales tales como (2S)-2-aminopropanamida, (2S)-2-amino-3-fenilpropanamida, (2S)-2-amino-3-hidroxiopropanamida, (2S)-2-amino-3-carboxipropanamida, (2S)-2,6-diaminooxanamida. El grupo NH mencionado anteriormente, como parte de un grupo radical de amidas primarias de aminoácidos naturales, representa el grupo amino del aminoácido natural.

$\text{R}'$  de Fórmula I se selecciona de

alquilo  $\text{C}_1-\text{C}_5$  lineal o ramificado, cicloalquilo  $\text{C}_3-\text{C}_6$ , alqueno  $\text{C}_2-\text{C}_5$  y trifluorometilo;

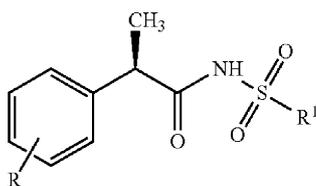
fenilo sustituido o no sustituido;

bencilo sustituido o no sustituido;

un grupo heteroarilo seleccionado de piridina, pirimidina, pirrol, tiofeno, furano, indol, tiazol y oxazol sustituido y no sustituido.

Los ejemplos de compuestos (2R)-2-fenilpropanamidas adecuados para usar en estos métodos incluyen, sin limitación, (2R)-2-[4-[(isopropilsulfonil]amino]fenil]propanamida; sal sódica de (2R)-2-[4-[(isopropilsulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(2-clorofenil)sulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(2,6-diclorofenil)sulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(metilsulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(fenilsulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(4-metilfenil)sulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(4-metoxifenil)sulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(bencilsulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(4-clorofenil)sulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(4-trifluorometil)fenil]sulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(tien-2-silsulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(ciclopentil-sulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(trifluorometil)sulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(isopropilsulfonil]amino]fenil]-N-metilpropanamida; (2R)-N-[(1S)-2-amino-1-metil-2-oxoetil]-2-[4-[(isopropilsulfonil]amino]fenil]propanamida; (2R)-2-[4-[(isopropilsulfonil]amino]fenil]-N-[4-(trifluorometil)-1,3-tiazol-2-il]propanamida; (2R)-2-[4-[(2-clorofenil)sulfonil]amino]fenil]-N-[4-(trifluorometil)-1,3-tiazol-2-il]propanamida; (2R)-2-[4-[(2-clorofenil)sulfonil]amino]fenil]-N-[2-(2-hidroxi-etoxi)etil]propanamida; (2R)-2-[4-[(2-clorofenil)sulfonil]amino]fenil]-N-ciclopropilpropanamida.

Otra clase de ejemplos de inhibidores de CXCR1/CXCR2 de molécula pequeña adecuados para su uso en estos métodos incluyen los descritos en la publicación de la patente de los Estados Unidos No. 20120202884 de Piemonti et al. (Dompe S.P.A), que tiene una fórmula general de Fórmula II como se muestra a continuación:

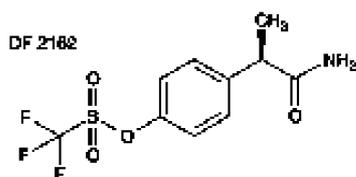


(II)

en la que  $\text{R}$  de Fórmula II se selecciona de 4-alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ ) lineal o ramificado, 4-trifluorometanosulfonilo o 3-benzoilo y  $\text{R}'$  de Fórmula II es alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ ) lineal o ramificado.

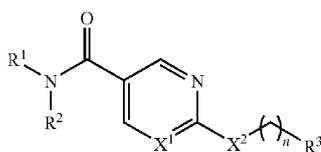
Los ejemplos de compuestos de Fórmula II adecuados para usar en estos métodos incluyen, sin limitación,  $\text{R}(-)-2-[(4\text{-isobutilfenil})\text{propionil}]\text{-metanosulfonamida}$  (también conocida como Repertaxina o Reparixina),  $\text{R}(-)-2-[(4\text{-trifluorometanosulfonilo})\text{fenil}]\text{propionil-metanosulfonamida}$  (también conocida como Meraxina).

Otra clase de ejemplos de inhibidores de CXCR1/CXCR2 de molécula pequeña adecuados para usar en estos métodos incluyen derivados de ácidos 2-arilfenilpropiónicos como lo describen Bertini et al. "Noncompetitive Allosteric Inhibitors of the Inflammatory Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2: Prevention of Reperfusion Injury", Proc Natl Acad Sci USA. 101: 11791-11796 (2004); Bizzarri et al., "ELR+ CXC Chemokines and Their Receptors (CXC Chemokine Receptor 1 and CXC Chemokine Receptor 2) as New Therapeutic Targets", --Pharmacol Ther. 112: 139-149 (2006); y Souza et al., "Repertaxin, A Novel Inhibitor of Rat CXCR2 Function, Inhibits Inflammatory Responses that Follow Intestinal Ischaemia and Reperfusion Injury", Br J Pharmacol. 143: 132-142 (2004)). Un ejemplo de compuesto en esta clase de inhibidores de CXCR1/CXCR2 incluye sulfonato de 4-[(1R)-2-amino-1-metil-2-oxoetil]fenil-trifluorometano (DF 2162) que tiene la estructura de Fórmula III a continuación y derivados del mismo.

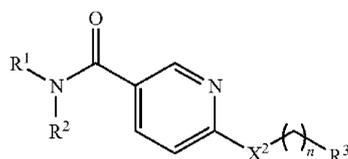


(III)

Otra clase de ejemplos de inhibidores ejemplares de CXCR1/CXCR2 de molécula pequeña incluye compuestos de piridinamida y pirimidincarboxamida como se describe en la publicación de la patente de los Estados Unidos No. 2010/0210593 de Maeda et al. (Syntrix Biosystems), que tienen las fórmulas de Fórmula IV y V como se muestra a continuación:



(IV)



(V)

10 en las que  $R^1$  y  $R^2$  de Fórmula IV y V se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, 2- o 3- o 4-halo-fenilo, heteroalquilo, alquilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, heterociclilo y heterocicilalquilo;

15 en las que  $R^3$  de Fórmula IV y V se selecciona de  $-B(R^4R^5)$ ,  $-R^6-B(R^4R^5)$ ,  $R^6$ ,  $-C(O)-R^6$ ,  $-OR^6$ ,  $-S(O)_yR^6$  (en la que  $y = 0, 1$  o  $2$ ),  $-P(O)-(R^4R^5)$  y  $-N(R^7R^8)$ ;

20 en las que  $R^6$  de Fórmula IV y V se selecciona de alquilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, heterociclilo y heterocicilalquilo;

en las que  $R^4$  y  $R^5$  de Fórmula IV y V son independientemente hidrógeno, hidroxilo, ariloxi o alcoxi, o en las que  $R^4$  y  $R^5$  juntos forman un éster cíclico o un anhídrido de ácido (ya sea mixto o simétrico);

25 en las que  $R^7$  y  $R^8$  de Fórmula IV y V se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo, haloalquilo, arilo, cicloalquilo, arilalquilo, heteroalquilo, heterociclilo y heterocicilalquilo;  $R^7$  y  $R^8$  son ambos oxígeno para formar un grupo nitro; o  $R^7$  y  $R^8$  junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un heterociclilo; y

30 en las que  $X^1$  de Fórmula IV y V es carbono o nitrógeno;  $X^2$  de Fórmula IV y V es  $-S(O)_y-$  (en la que  $y = 0, 1$  o  $2$ ), nitrógeno u oxígeno; y  $n$  de Fórmula IV y V es un número entero entre 0 y 8

Otros inhibidores de CXCR1/CXCR2 bien conocidos de molécula pequeña incluyen, sin limitación, 2-hidroxi-N,N-dimetil-3-[[2-[[1(R)-(5-metil-2-furanilo)propil]amino]-3,4-dioxo-1-ciclobuten-1-il]amino]benzamida (SCH-527123) (véase la patente de los Estados Unidos No. 8.183.287 de Kou et al.), N-2-hidroxi-3-dimetilsulfonlamido-4-clorofenil)-N'-(2-bromofenil)-N'-cianoguanidina (SCH-468477), SCH-479833 y sus derivados (véase Singh et al., "Small-Molecule Antagonists for CXCR2 and CXCR1 Inhibit Human Melanoma Growth by Decreasing Tumor Cell Proliferation, Survival, and Angiogenesis", Clin. Cancer Res. 15: 2380 (2009)). Los inhibidores adicionales de CXCR1/CXCR2 de molécula pequeña que son adecuados para usar en la presente invención incluyen los descritos en la patente de los Estados Unidos No. 7.326.729 de Chao et al..

40 Una composición adecuada para inhibir la interacción de *S. aureus* con CXCR1 y CXCR2 comprende un agente que inhibe CXCR1 y un agente que inhibe CXCR2. Los inhibidores de CXCR2 adecuados incluyen, sin limitación, N-(2-hidroxi-4-nitrofenil)-N'-(2-bromofenil)urea (SB-225002) (White et al., "Identification of a Potent, Selective Non-Peptide CXCR2 Antagonists That Inhibits Interleukin-8-Induced Neutrophil Migration", J. Biol. Chem. 273: 10095-10098 (1998)), N-(3-(aminosulfonil)-4-cloro-2-hidroxifenil)-N'-(2,3-diclorofenil)urea (Podolin et al., "A Potent and Selective Nonpeptide Antagonist of CXCR2 Inhibits Acute and Chronic Models of Arthritis in the Rabbit", J. Immunology 169(11): 6435-6444 (2002)), N-(2-hidroxi-3-sulfamil-4-clorofenil)-N'-(2,3-diclorofenil)urea (SB-332235), SB-656933, aminopiridina y carboxamidas de aminopirimidina como se describe en el documento WO2012027289 de Maeda et al., los compuestos

45

de tiazol(4,5-D)pirimidina como se describen en el documento WO2001/025242 de Willis et al. y los derivados de escuaramida como se describe en las publicaciones de patente de los Estados Unidos Nos. 2010029670 de Baettig et al., y US20100152205 de Hunt et al.. Los inhibidores adicionales de CXCR2 de molécula pequeña incluyen los descritos en la patente de los Estados Unidos No. 7.579.342 de Bonnert et al., y la publicación de patente de los Estados Unidos No. 20050272750 de Brough et al..

La composición puede comprender uno o más anticuerpos que inhiben la interacción de *S. aureus* con CXCR1 y CXCR2. Los anticuerpos adecuados incluyen un anticuerpo de bloqueo de CXCR1 o una porción de unión a anticuerpo del mismo (véase, por ejemplo, Ginestier et al., "CXCR1 Blockade Selectively Targets Human Breast Cancer Stem Cells In Vitro and In Xenografts", J. Clin. Invest. 120(2): 485-497 (2010)), un anticuerpo de bloqueo de CXCR2 o una porción de unión a anticuerpo del mismo (véase por ejemplo, Nemzek et al., "Functional Contribution of CXCR2 to Lung Injury After Aspiration of Acid and Gastric Particulates", Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 298(3): L382-L391 (2010)), o una combinación de anticuerpos CXCR1 y CXCR2. Alternativamente, los anticuerpos adecuados incluyen aquellos que se unen a las regiones de las proteínas LukE y HlgA de *S. aureus* que interactúan con CXCR1 y CXCR2. Un ejemplo de anticuerpo de este tipo incluye un anticuerpo, o una porción de unión a anticuerpo del mismo, que reconoce y se une a un epítipo de LukE de *S. aureus* que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 (QSPNGPTGSAREYFA), correspondiente a los residuos de aminoácidos 182- 196 de la SEQ ID NO: 4. Otro ejemplo de anticuerpo de este tipo incluye un anticuerpo, o una porción de unión a anticuerpo del mismo, que reconoce y se une a un epítipo de HlgA de *S. aureus* que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 (QDPTGPAARDYFV), correspondiente a los residuos de aminoácidos 180- 192 de la SEQ ID NO: 6. Los anticuerpos que se unen a las regiones de unión al receptor de CXCR1/CXCR2 de LukE y HlgA se describen con más detalle a continuación.

Se describe también un método para prevenir o tratar la infección por *Staphylococcus aureus* y/o una afección resultante de una infección por *S. aureus* en un sujeto. Este método implica seleccionar un sujeto que tenga o esté en riesgo de tener una infección por *S. aureus* y administrar, al sujeto seleccionado, una composición que inhiba la interacción de *S. aureus* con el receptor de antígeno Duffy para quimiocinas (DARC) (es decir, inhibiendo la interacción de DARC con LukE y/o HlgA), bajo condiciones efectivas para prevenir o tratar la infección por *S. aureus* y/o una condición resultante de una infección por *S. aureus* en el sujeto.

Las composiciones adecuadas para inhibir la interacción de *S. aureus* con DARC incluyen inhibidores o antagonistas de DARC. Un ejemplo de inhibidor de DARC para su uso en los métodos de la presente invención es un anticuerpo de bloqueo de DARC (véase, por ejemplo, Patterson et al., "Expression of the Duffy Antigen/Receptor for Chemokines (DARC) by the Inflamed Synovial Endothelium", J. Pathol. 197(1): 108-116 (2002)).

Los sujetos adecuados para el tratamiento de acuerdo con estos métodos incluyen, sin limitación, cualquier animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano. Los sujetos adecuados incluyen tanto lactantes, como jóvenes y adultos inmunocomprometidos y no inmunocomprometidos. En una realización, el sujeto tiene o está en riesgo de tener una infección por *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA). En otra realización, el sujeto tiene o está en riesgo de tener una infección por *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA). Otros sujetos adecuados incluyen aquellos sujetos que pueden tener o están en riesgo de desarrollar una afección resultante de una infección por *S. aureus*, es decir, una afección asociada a *S. aureus*, tal como, por ejemplo, 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.

En una realización, las composiciones de la presente invención se administran profilácticamente para prevenir, retrasar o inhibir el desarrollo de infección por *S. aureus* en un sujeto en riesgo de contraer una infección por *S. aureus* o una afección asociada. En algunas realizaciones, la administración profiláctica de una o más composiciones de la presente invención es efectiva para prevenir completamente la infección por *S. aureus* en un individuo. En otras realizaciones, la administración profiláctica es efectiva para prevenir la extensión completa de la infección que de otra forma se desarrollaría en ausencia de dicha administración, es decir, prevenir, inhibir o minimizar sustancialmente la infección por *S. aureus* en un individuo.

En otra realización, las composiciones de la presente invención se administran terapéuticamente a un individuo que tiene una infección por *S. aureus* para inhibir la progresión y el desarrollo adicional de la infección, es decir, para inhibir y/o prevenir la propagación de la infección a otras células en un individuo, disminuir la infección y tratar o aliviar uno o más síntomas de infección.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención se pueden administrar como parte de una terapia de combinación junto con uno o más de otros agentes activos, dependiendo de la naturaleza de la infección por *S. aureus* que se está tratando. Dichos 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. Otros agentes antiinfecciosos incluyen un inhibidor de LukAB como se describe en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2011/0274693 de Torres et al.; un inhibidor o anticuerpo de LukED

como se describe en la publicación de la patente de los Estados Unidos No. 2013/0017203 de Torres et al.; un inhibidor de CCR5 como se describe en la publicación de patente de los Estados Unidos No. 2013/0039885 de Torres et al. y un inhibidor de CD11b como se describe en la solicitud internacional de patente con serial No PCT/US2013/032436 de Torres et al..

Los agentes antibióticos representativos y los agentes antimicrobianos que pueden ser útiles incluyen penicilinas resistentes a la penicilinasasa, cefalosporinas y carbapenemas, 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 dosis de estos antibióticos son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, MERCK MANUAL OF DIAGNOSIS AND THERAPY (Beers & Berkow eds., 2004)). Los agentes antiinfecciosos, antibióticos y/o antimicrobianos pueden combinarse antes de la administración, o administrarse simultáneamente (como parte de la misma composición o por medio de una composición diferente) o secuencialmente con estas composiciones. En ciertas realizaciones, la administración se repite.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse en una dosis única, o de acuerdo con un protocolo de dosificación múltiple. Por ejemplo, en una realización, se administran relativamente pocas dosis de la composición terapéutica, tales como una o dos dosis. En otra realización, la composición terapéutica se administra con más frecuencia, por ejemplo, diariamente hasta que el nivel de infección disminuye o desaparece. En las realizaciones que incluyen la terapia antibiótica convencional, que generalmente implica múltiples dosis durante un período de días o semanas, los antibióticos se pueden tomar una, dos o tres o más veces al día durante un período de tiempo, tal como durante al menos 5 días, 10 días o incluso 14 o más días, mientras que las composiciones se administran solo una o dos veces. Sin embargo, las diferentes dosis, el momento de las dosis y las cantidades relativas de la composición terapéutica y los antibióticos pueden y deben ser seleccionados y ajustados por un experto en la materia en función del sujeto y la infección a tratar.

En el contexto del uso de composiciones que inhiben la unión de LukE y/o HlgA a CXCR1/CXCR2 y/o DARC para prevenir una infección por *S. aureus*, la concentración de estas composiciones debe ser adecuada para lograr la prevención o prevención sustancial de infección por *S. aureus*, particularmente la prevención de *S. aureus* en poblaciones susceptibles (es decir, un lactante, joven, adulto o un lactante, joven o adulto inmunocomprometido). En el contexto del uso de composiciones terapéuticas para tratar una infección por *S. aureus*, la dosis de una composición inhibidora es una que es adecuada para inhibir la citotoxicidad mediada por LukE y/o HlgA y es capaz 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 adicional de al menos un síntoma, o incluso un alivio total de la infección o síntomas de la misma.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente o composición como se describe en el presente documento se determina 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* a tratar o prevenir, y detalles del sujeto, tales como la edad, el peso y el estado general de salud e inmunitario. Se puede encontrar orientación general, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Company 1990). Un médico puede administrar una composición que inhibe LukE y/o HlgA 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.

Los agentes y composiciones de la presente invención pueden administrarse por medios parenteral, tópico, intravenoso, oral, subcutáneo, intraperitoneal, intranasal o intramuscular para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico.

Los agentes y composiciones pueden formularse para administración parenteral. Las soluciones o suspensiones del agente pueden prepararse en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas en aceites. Los aceites ilustrativos son los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja o aceite mineral. En general, el agua, la solución salina, la dextrosa acuosa y la solución de azúcar relacionada, y los glicoles, como el propilenglicol o el 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 adecuadas 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 hasta un grado que permita recogerla en una jeringa fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales.

Cuando es deseable administrar los agentes y composiciones de la presente invención sistémicamente, pueden

5 formularse para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

10 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 los compuestos deseados, evitando múltiples inyecciones y múltiples manipulaciones.

15 Además de las formulaciones descritas previamente, los agentes también pueden formularse como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (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.

20 Se describe también un método para tratar a un sujeto que tiene una infección por *S. aureus*. Este método implica obtener una muestra del sujeto que tiene infección por *S. aureus* y cuantificar los niveles de expresión de CXCR1, CXCR2, DARC o una combinación de los mismos en la muestra. El método implica además administrar un tratamiento para el sujeto con base en los niveles de expresión cuantificados.

La muestra del sujeto puede comprender una muestra de sangre, tejido, célula o suero.

25 La cuantificación de los niveles de expresión de CXCR1, CXCR2, DARC implica medir la expresión de ARNm de CXCR1, CXCR2 y/o DARC en la muestra del sujeto. Los métodos para detectar y cuantificar los niveles de expresión de ARNm en una muestra son bien conocidos en la técnica y generalmente se describen a continuación.

30 El ARNm de un sujeto puede aislarse y prepararse a partir de muestras de tejido o células usando métodos conocidos en la técnica. La preparación de ARN debe producir ARNm manipulable enzimáticamente o ARN analizable. El ARN total y el ARNm pueden aislarse usando métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a ultracentrifugación con isotiocianato de guanidinio, extracción con guanidinio y fenol-cloroformo, extracción con cloruro de litio-SDS urea o por el método de oligo (dT) celulosa. El ARN total aislado se puede usar para generar una copia de la primera cadena de ADN (ADNc) usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, usando cebadores aleatorios, cebadores oligo-dT o cebadores oligo-dT aleatorios. Luego, el ADNc se usa como plantilla para una reacción de amplificación de primera ronda o para una reacción de PCR cuantitativa dependiendo de la abundancia del objetivo o de la muestra. La primera ronda de amplificación por PCR se realiza con un conjunto de cebadores, que incluye cebadores directos e inversos que son específicos para el gen objetivo de interés (es decir, CXCR1, CXCR2 o DARC). Después de la primera ronda de amplificación, se utiliza una porción limpia del producto de reacción para el análisis cuantitativo. Los protocolos cuantitativos de PCR en tiempo real generalmente se basan en la detección fluorescente de la formación del producto después de la fase de extensión del ciclo de reacción. Los enfoques fluorescentes típicos para la PCR cuantitativa se basan en tintes informadores fluorescentes tal como SYBR Green, FAM, fluoresceína, HEX, TET, TAMRA, etc. y tintes de extinción tales como DABSYL, Black Hole, etc. Sistemas, tales como Molecular Beacons (Integrated ADN Technologies, Coralville, Iowa), sondas Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, California), sondas LNA o MGB, los cebadores Scorpion® (DxS Ltd., Manchester, Reino Unido), los cebadores AmpliFluor, Plexor o Lux también son bien conocidos en la técnica del análisis cuantitativo de genes. Se pueden encontrar ejemplos de métodos y reactivos relacionados con sondas en tiempo real en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.925.517, 6.103.476, 6.150.097 y 6.037.130 todas de Tyagi et al..

50 La expresión cuantitativa de genes puede expresarse como número de copia absoluto o como expresión relativa de genes. Ambos métodos utilizan una curva estándar desde la cual obtener datos cuantitativos con precisión. El nivel de expresión de ARNm medido en la muestra se compara típicamente con el nivel de expresión de ARNm medido en una muestra de referencia o control, por ejemplo, el nivel de expresión promedio en una población de control, el nivel de expresión promedio en una población clínica de pacientes con una susceptibilidad conocida a infección por *S. aureus*, y/o un nivel de expresión promedio en una población clínica de pacientes con resistencia conocida a la infección por *S. aureus*.

55 La cuantificación de los niveles de expresión de CXCR1, CXCR2, DARC implica medir la expresión de la proteína CXCR1, CXCR2 y/o DARC en la muestra del sujeto. Los métodos para detectar y cuantificar los niveles de expresión de proteínas en una muestra son bien conocidos en la técnica y generalmente se describen a continuación.

60 La proteína de muestra del sujeto puede aislarse y prepararse a partir de una muestra usando métodos de preparación estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden lisar en un tampón que contiene un detergente, tal como dodecil sulfato de sodio (SDS) y un cóctel de inhibidores de proteasa. El rendimiento de proteína puede determinarse usando el ensayo de Bradford o cualquier variación del método conocida en la técnica. La evaluación del nivel de expresión de una proteína objetivo dentro de una muestra se puede realizar mediante diversas técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, evaluar el nivel de expresión puede implicar analizar una o más proteínas mediante electroforesis en gel bidimensional, espectroscopía de masas, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC),

5 cromatografía líquida rápida de proteínas, cromatografía líquida multidimensional seguida de espectrometría de masas en tándem o análisis de expresión de chips de proteína. Otras técnicas implican poner en contacto la muestra con uno o más reactivos detectables que sean adecuados para medir la expresión de proteínas, por ejemplo, un anticuerpo marcado que tenga especificidad de unión para CXCR1, CXCR2 o DARC, o un anticuerpo primario que tenga  
 10 especificidad de unión para CXCR1, CXCR2 o DARC, usado en conjunto con un anticuerpo secundario, y midiendo el nivel de expresión de la proteína con base en el nivel de reactivo detectable en la muestra después de normalizar con respecto a la proteína total en la muestra. Los métodos adecuados para detectar el nivel de expresión de proteínas en una muestra, por ejemplo, una muestra de sangre o suero, que se emplean comúnmente en la técnica incluyen, por ejemplo y sin limitación, transferencia Western, inmunoprecipitación, ensayo de inmunosorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). El nivel de expresión  
 15 de proteína medido en la muestra se compara típicamente con el nivel de expresión de proteína medido en una muestra de referencia o control, por ejemplo, el nivel de expresión promedio en una población de control, el nivel de expresión promedio en una población clínica de pacientes con una susceptibilidad conocida a infección por *S. aureus*, y/o un nivel de expresión promedio en una población clínica de pacientes con resistencia conocida a la infección por *S. aureus*.

20 Un aumento o un alto nivel de expresión de CXCR1, CXCR2 o DARC en comparación con el nivel de expresión en una población de referencia normal o un nivel similar de expresión de CXCR1, CXCR2 o DARC en comparación con el nivel de expresión en una población de referencia que tenga una susceptibilidad conocida a la infección por *S. aureus*, generalmente indicaría que el sujeto puede tener una mayor susceptibilidad o una mayor sensibilidad a la infección por *S. aureus*. Por consiguiente, debe emplearse un régimen de tratamiento terapéutico más agresivo e incluir uno o más agentes o composiciones que inhiban la interacción de *S. aureus* con CXCR1, CXCR2 o DARC. Una expresión disminuida o de bajo nivel de CXCR1, CXCR2 o DARC en comparación con un control normal o una población de referencia indicaría que el sujeto tiene una mayor resistencia a la infección por *S. aureus*. Un tratamiento  
 25 adecuado aún incluiría uno o más agentes o composiciones para prevenir o minimizar la infección. Sin embargo, el régimen de dosificación es menos agresivo que el régimen de dosificación en un sujeto más altamente susceptible a la infección.

30 Se describe un anticuerpo aislado de leucocidina E (LukE), o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión al mismo, se une a un epítipo correspondiente al residuo de aminoácido 182-196 de la SEQ ID NO: 4.

35 Se describe un anticuerpo HlgA aislado, o un fragmento de unión a anticuerpo del mismo, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión del mismo, se une a un epítipo correspondiente al residuo de aminoácido 180-192 de la SEQ ID NO: 6.

40 En este contexto, 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 (por ejemplo, un anticuerpo IgG) (es decir, naturales o formadas por procesos recombinantes de fragmentos de genes de inmunoglobulina normales) y fragmentos inmunológicamente activos de las mismas (es decir, incluyendo la porción de unión específica de la molécula de inmunoglobulina de longitud completa), que nuevamente puede ser de naturaleza natural o sintética. En consecuencia, el término "fragmento de anticuerpo" incluye una porción de un anticuerpo tal como F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, scFv, sdAb (nanocuerpo) y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que reconoce el anticuerpo de longitud completa y, en el contexto de la presente invención, se une específicamente a las regiones de unión al receptor CXCR1/CXCR2 o DARC de LukE y HlgA. Los métodos de fabricación y selección de fragmentos de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

50 Los anticuerpos anti-LukE y anti-HlgA pueden tener cierto grado de reactividad cruzada con otras subunidades S de leucocidina de estafilococo tales como HlgC, LukS-PVL, LukS-I, LukA y LukM. Los anticuerpos anti-LukE y/o anti-HlgA terapéuticamente eficaces inhiben o reducen la unión de LukE y/o HlgA a la unión de CXCR1/CXCR2 o DARC. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-LukE y/o anti-HlgA neutralizan (por ejemplo, eliminan sustancialmente) la actividad de LukE y HlgA, respectivamente.

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

65 En general, los dominios variables muestran una variabilidad considerable de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo al siguiente, particularmente en la ubicación del sitio de unión al antígeno. Tres regiones, llamadas regiones

hipervariables o determinantes de complementariedad (CDR), se encuentran en cada una de las VL y VH, que están respaldadas por regiones menos variables llamadas regiones variables marco. Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos monoclonales IgG, así como fragmentos de anticuerpos o formas modificadas. Estos son, por ejemplo, fragmentos Fv o proteínas en las que las CDR y/o los dominios variables de los anticuerpos ejemplificados se modifican como proteínas de unión a antígeno de cadena sencilla.

La porción de un anticuerpo que consiste en los dominios VL y VH se designa como un Fv (Fragmento variable) y constituye el sitio de unión al antígeno. Un Fv de cadena sencilla (scFv o SCA) es un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio VL y un dominio VH en una cadena de polipéptidos, en el que el terminal N de un dominio y el terminal C del otro dominio están unidos por un enlazador flexible. Los enlazadores peptídicos utilizados para producir los anticuerpos de cadena sencilla son típicamente péptidos flexibles, seleccionados para asegurar que se produzca el plegamiento tridimensional adecuado de los dominios VL y VH. El enlazador tiene generalmente de 3 a 50 residuos de aminoácidos, y en algunos casos es más corto, por ejemplo, de aproximadamente 3 a 30 residuos de aminoácidos, o de 3 a 25 residuos de aminoácidos, o incluso de 3 a 15 residuos de aminoácidos. Un ejemplo de tales péptidos enlazadores incluye repeticiones de cuatro residuos de glicina seguidos de un residuo de serina.

Los anticuerpos de cadena sencilla carecen de algunos o de todos los dominios constantes de los anticuerpos completos de los que derivan. Por lo tanto, pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos completos. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla tienden a estar libres de ciertas interacciones no deseadas entre regiones constantes de cadena pesada y otras moléculas biológicas. Además, los anticuerpos de cadena sencilla son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y pueden tener una mayor permeabilidad que los anticuerpos completos, lo que permite que los anticuerpos de cadena sencilla se localicen y se unan a los sitios de unión al antígeno más eficientemente. Además, el tamaño relativamente pequeño de los anticuerpos de cadena sencilla los hace menos propensos a provocar una respuesta inmune no deseada en un receptor que los anticuerpos completos.

Los anticuerpos de dominio único (sdAb; nanocuerpo) son fragmentos de anticuerpos que consisten en un dominio de anticuerpo variable monomérico único (~12-15 kDa). Los sdAb se derivan del dominio variable de una cadena pesada (VH) o del dominio variable de una cadena ligera (VL). Los sdAb se pueden producir de forma natural, es decir, mediante la inmunización de dromedarios, camellos, llamas, alpacas o tiburones (Ghahroudi et al., "Selection and Identification of Single Domain Antibody Fragments from Camel Heavy-Chain Antibodies", FEBS Letters 414(3): 521-526 (1997)). Alternativamente, el anticuerpo puede producirse en microorganismos o derivarse de anticuerpos completos convencionales (Harmsen et al., "Properties, Production, and Applications of Camelid Single-Domain Antibody Fragments", Appl. Microbiol. Biotechnology 77: 13-22 (2007), Holt et al., "Domain Antibodies: Proteins for Therapy", Trends Biotech. 21(11): 484-490 (2003)).

Fab (fragmento, unión a antígeno) se refiere a los fragmentos del anticuerpo que consisten en los dominios VL, CL, VH y CH1. Los generados después de la digestión con papaína simplemente se denominan Fab y no retienen la región bisagra de cadena pesada. Después de la digestión con pepsina, se generan varios Fab que retienen la bisagra de cadena pesada. Aquellos fragmentos con los enlaces disulfuro entre cadenas intactos se denominan F(ab')<sub>2</sub>, mientras que un Fab' único se produce cuando los enlaces disulfuro no se retienen. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> 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 de Fc, la activación de la citotoxicidad mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Para anticuerpos como IgA e IgM, que son complejos de múltiples proteínas similares a IgG, la formación de complejos requiere dominios constantes de Fc.

La "especificidad" del 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 bien interactuar con una molécula. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas 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 primaria de aminoácidos de la proteína. En un epítipo conformacional, los puntos de interacción ocurren a través de residuos de aminoácidos en la proteína que están separados entre sí, es decir, aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente 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 pueden verificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden ser murinos, humanos, humanizados o quiméricos. Un anticuerpo humanizado es una proteína recombinante en la que las CDR de un anticuerpo de una especie, por ejemplo, un anticuerpo de roedor, conejo, perro, cabra, caballo o pollo (o cualquier otro anticuerpo animal adecuado), se transfieren a dominios humanos variables pesados y ligeros. 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 tienen preferiblemente regiones constantes derivadas sustancial o exclusivamente de regiones constantes de anticuerpos humanos y regiones variables derivadas sustancial o exclusivamente de la secuencia de la región variable de un mamífero distinto de un humano. El proceso de quimerización se puede hacer más efectivo reemplazando también las regiones variables, que no sean las regiones hipervariables o las regiones determinantes de la 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 por dos epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos son preferiblemente humanos o humanizados.

Los anticuerpos descritos anteriormente pueden obtenerse de acuerdo con técnicas estándar. Por ejemplo, LukE, HlgA, o un fragmento inmunológicamente activo de LukE o HlgA que contiene los epítomos de unión al receptor deseados se pueden administrar a un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un humano o un ratón, o en el caso de nanocuerpos un dromedario, camello, llama o tiburón). Las leucocidinas pueden usarse solas como inmunógenos o pueden unirse a una proteína transportadora u otro material transportador, tal como perlas de sefarosa. Después de que el animal ha producido anticuerpos, se aísla una mezcla de células productoras de anticuerpos, tales como esplenocitos, a partir de los cuales 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 cosechan del medio de cultivo.

La presente invención se dirige a una composición que comprende una proteína leucocidina E (LukE) aislada o un polipéptido de la misma que tiene un dominio de unión a CXCR1/CXCR2 no funcional y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se describe en el presente documento, los solicitantes han identificado que la región de unión al receptor CXCR1/CXCR2 de LukE comprende los residuos de aminoácidos 182-196 de la proteína LukE soluble (SEQ ID NO: 4). Por consiguiente, una proteína LukE aislada que tiene un dominio de unión a CXCR1/CXCR2 no funcional contiene una o más sustituciones o eliminaciones de residuos de aminoácidos dentro de esta región identificada (es decir, 182-196 de la SEQ ID NO: 4) que interrumpen la unión al receptor. En una realización de la presente invención, la proteína LukE aislada que tiene un dominio de unión a CXCR1/CXCR2 no funcional ("LukE<sup>LukS-DR4</sup>") tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 como se muestra a continuación.

```

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

```

40

## ES 2 811 527 T3

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

5 Los polipéptidos LukE adecuados que contienen un dominio de unión al receptor CXCR1/CXCR2 no funcional son de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, más preferiblemente entre aproximadamente 100-200 aminoácidos de longitud o entre aproximadamente 200-250 aminoácidos de longitud. Un ejemplo de polipéptido LukE aislado comprende los residuos de aminoácidos 1-273 de la SEQ ID NO: 4, los residuos de aminoácidos 20-263 de la SEQ ID NO: 4, o los residuos de aminoácidos 20-273 de la SEQ ID NO: 4, y contiene una o más sustituciones o eliminaciones de residuos de aminoácidos dentro de la región de unión al receptor CXCR1/CXCR2 (es decir, residuos de aminoácidos 182-196). En una realización de la presente invención, el  
 10 polipéptido LukE aislado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 como se muestra a continuación.

Val Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln Phe Asp Phe  
 1 5 10 15  
 Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val Lys Met Gln  
 20 25 30  
 Gly Phe Ile Asn Ser Arg Thr Ser Phe Ser Asp Val Lys Gly Ser Gly  
 35 40 45  
 Tyr Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly  
 50 55 60

# ES 2 811 527 T3

```

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

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

Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser Phe
                               100                              105                              110

Asn Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr Val Ser Glu
115                               120

Val Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val Lys Ala Asn
130                               135                              140

Glu Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp Arg Tyr Leu
145                               150                              155                              160

Phe Val Gly Tyr Lys Pro Tyr Ser Gln Asn Pro Arg Asp Tyr Phe Val
                               165                              170                              175

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
                               180                              185                              190

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu
195                               200                              205

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

Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His Asn Ala Phe Val
225                               230                              235                              240

Asn Arg Asn

```

5 En al menos una realización, el polipéptido Luke que contiene un dominio de unión al receptor CXCR1/CXCR2 no funcional tiene, por ejemplo, una o más sustituciones o eliminaciones del aminoácido P184, G186, P187, G189, o cualquier combinación de los mismos (es decir, se contemplan todos, los mutantes simples, mutantes dobles, mutantes triples y mutantes cuádruples). Los ejemplos adecuados incluyen, sin limitación, Luke<sup>LukS-DR4</sup> (es decir, SEQ ID NO: 8), Luke<sup>20-263LukS-DR4</sup> (es decir, SEQ ID NO: 9), Luke<sup>P184A, G186A, P187A</sup> (es decir, SEQ ID NO: 10, que se muestra a continuación) y Luke<sup>P184A, G186A, P187A, G189A</sup> (es decir, SEQ ID NO: 11, que se muestra a continuación).

SEQ ID NO:10; Luke<sup>P184A,G186A,P187A</sup>

```

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

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

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

Lys Met Gln Gly Phe Ile Asn Ser Arg Thr Ser Phe Ser Asp Val Lys
50                               55                              60

```

10

# ES 2 811 527 T3

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

## SEQ ID NO:11; LukE<sup>P184A,G186A,P187A,G189A</sup>

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

# ES 2 811 527 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

5 La composición de la presente invención puede comprender además una proteína leucocidina (LukD) aislada o un polipéptido de la misma. La proteína LukD aislada puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 como se muestra a continuación o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de similitud de secuencia con la SEQ ID NO: 12 (secuencia de aminoácidos de LukD).

```

Ala Gln His Ile Thr Pro Val Ser Glu Lys Lys Val Asp Asp Lys Ile
1                                     5                                     10                                     15

Thr Leu Tyr Lys Thr Thr Ala Thr Ser Asp Asn Asp Lys Leu Asn Ile
20                                     25                                     30

Ser Gln Ile Leu Thr Phe Asn Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr Asp Lys
35                                     40                                     45

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

Lys Pro Asn Pro Lys Asp Tyr Asn Tyr Ser Gln Phe Tyr Trp Gly Gly
65                                     70                                     75                                     80

Lys Tyr Asn Val Ser Val Ser Ser Glu Ser Asn Asp Ala Val Asn Val
85                                     90                                     95

```

10

## ES 2 811 527 T3

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

5 Los polipéptidos LukD adecuados tienen una longitud de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 aminoácidos, más preferiblemente entre aproximadamente 100-200 aminoácidos de longitud o entre aproximadamente 200-250 aminoácidos de longitud. Un ejemplo de polipéptido LukD aislado comprende los residuos de aminoácidos 1-286 de la SEQ ID NO: 12, los residuos de aminoácidos 20-281 de la SEQ ID NO: 12 o los residuos de aminoácidos 20-286 de la SEQ ID NO: 12. Los polipéptidos LukD adecuados también incluyen aquellos polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente un 70-80% de similitud de secuencia, preferiblemente un 80-90% de similitud de secuencia, más preferiblemente un 90-95% de similitud de secuencia, y lo más preferiblemente un 95-99% de similitud de secuencia con los residuos aminoácido 1-286 de la SEQ ID NO: 12, los residuos de aminoácidos 20-281 de la SEQ ID NO: 11, o los residuos de aminoácidos 20-286 de la SEQ ID NO: 12.

15 Se describe también una composición que comprende una proteína HlgA aislada o un polipéptido de la misma que tiene un dominio de unión a CXCR1/CXCR2 no funcional y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Como se describe en el presente documento, los solicitantes han identificado que la región de unión al receptor CXCR1/CXCR2 de HlgA comprende los residuos de aminoácidos 180-192 de la proteína HlgA soluble (SEQ ID NO: 6). Por consiguiente, una proteína HlgA aislada que tiene un dominio de unión a CXCR1/CXCR2 no funcional contiene una o más sustituciones o eliminaciones de residuos de aminoácidos dentro de esta región identificada (es decir, 180-192 de la SEQ ID NO: 6) que interrumpen la unión al receptor. En una realización, la proteína HlgA aislada que tiene un dominio de unión a CXCR1/CXCR2 no funcional ("HlgA<sup>LukS-DR4</sup>") tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 como se muestra a continuación

## ES 2 811 527 T3

```

Glu Asn Lys Ile Glu Asp Ile Gly Gln Gly Ala Glu Ile Ile Lys Arg
1           5           10           15
Thr Gln Asp Ile Thr Ser Lys Arg Leu Ala Ile Thr Gln Asn Ile Gln
20           25           30
Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Val Val
35           40           45
Lys Met Gln Gly Phe Ile Ser Ser Arg Thr Thr Tyr Ser Asp Leu Lys
50           55           60
Lys Tyr Pro Tyr Ile Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile
65           70           75           80
Ser Leu Lys Thr Lys Asp Ser Asn Val Asp Leu Ile Asn Tyr Leu Pro
85           90           95
Lys Asn Lys Ile Asp Ser Ala Asp Val Ser Gln Lys Leu Gly Tyr Asn
100          105          110
Ile Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Ser Gly Ser
115          120          125
Phe Asn Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Asn Tyr Val Thr
130          135          140
Glu Val Glu Ser Gln Asn Ser Lys Gly Val Lys Trp Gly Val Lys Ala
145          150          155          160
Asn Ser Phe Val Thr Pro Asn Gly Gln Val Ser Ala Tyr Asp Gln Tyr
165          170          175
Leu Phe Ala Gly Tyr Lys Pro Tyr Ser Gln Asn Pro Arg Asp Tyr Phe
180          185          190
Val Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Ile Gln Ser Gly Phe Asn Pro
195          200          205
Ser Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Arg Gly Lys Gly Asp Lys Ser
210          215          220
Glu Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn Met Asp Ala Thr Tyr Ala Tyr
225          230          235          240
Val Thr Arg His Arg Leu Ala Val Asp Arg Lys His Asp Ala Phe Lys
245          250          255
Asn Arg Asn Val Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu
260          265          270
Val Lys Ile Lys Ser Ile Thr Pro Lys
275          280

```

- 5 Los polipéptidos HlgA adecuados que contienen un dominio de unión al receptor CXCR1/CXCR2 no funcional tienen una longitud de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 aminoácidos, más preferiblemente entre aproximadamente 100-200 aminoácidos de longitud o entre aproximadamente 200-250 aminoácidos de longitud. Un ejemplo de polipéptido HlgA aislado comprende los residuos de aminoácidos 1-268 de la SEQ ID NO: 6, los residuos de aminoácidos 20-258 de la SEQ ID NO: 6 o los residuos de aminoácidos 20-268 de la SEQ ID NO: 6, y contiene uno o más sustituciones o eliminaciones de residuos de aminoácidos dentro de la región de unión al receptor CXCR1/CXCR2 (es decir, residuos de aminoácidos 180-192). En una realización, el polipéptido HlgA aislado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 como se muestra a continuación.
- 10

## ES 2 811 527 T3

Ile	Thr	Ser	Lys	Arg	Leu	Ala	Ile	Thr	Gln	Asn	Ile	Gln	Phe	Asp	Phe	1	5	10	15
Val	Lys	Asp	Lys	Lys	Tyr	Asn	Lys	Asp	Ala	Leu	Val	Val	Lys	Met	Gln	20	25	30	
Gly	Phe	Ile	Ser	Ser	Arg	Thr	Thr	Tyr	Ser	Asp	Leu	Lys	Lys	Tyr	Pro	35	40	45	
Tyr	Ile	Lys	Arg	Met	Ile	Trp	Pro	Phe	Gln	Tyr	Asn	Ile	Ser	Leu	Lys	50	55	60	
Thr	Lys	Asp	Ser	Asn	Val	Asp	Leu	Ile	Asn	Tyr	Leu	Pro	Lys	Asn	Lys	65	70	75	80
Ile	Asp	Ser	Ala	Asp	Val	Ser	Gln	Lys	Leu	Gly	Tyr	Asn	Ile	Gly	Gly	85	90	95	
Asn	Phe	Gln	Ser	Ala	Pro	Ser	Ile	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Phe	Asn	Tyr	100	105	110	
Ser	Lys	Thr	Ile	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Val	Thr	Glu	Val	Glu	115	120	125	
Ser	Gln	Asn	Ser	Lys	Gly	Val	Lys	Trp	Gly	Val	Lys	Ala	Asn	Ser	Phe	130	135	140	
Val	Thr	Pro	Asn	Gly	Gln	Val	Ser	Ala	Tyr	Asp	Gln	Tyr	Leu	Phe	Ala	145	150	155	160
Gly	Tyr	Lys	Pro	Tyr	Ser	Gln	Asn	Pro	Arg	Asp	Tyr	Phe	Val	Pro	Asp	165	170	175	
Asn	Gln	Leu	Pro	Pro	Leu	Ile	Gln	Ser	Gly	Phe	Asn	Pro	Ser	Phe	Ile	180	185	190	
Thr	Thr	Leu	Ser	His	Glu	Arg	Gly	Lys	Gly	Asp	Lys	Ser	Glu	Phe	Glu	195	200	205	
Ile	Thr	Tyr	Gly	Arg	Asn	Met	Asp	Ala	Thr	Tyr	Ala	Tyr	Val	Thr	Arg	210	215	220	
His	Arg	Leu	Ala	Val	Asp	Arg	Lys	His	Asp	Ala	Phe	Lys	Asn	Arg	Asn	225	230	235	240

- 5 En al menos una realización, el polipéptido HlgA que contiene un dominio de unión al receptor CXCR1/CXCR2 no funcional tiene, por ejemplo, una o más sustituciones o eliminaciones del aminoácido P182, G184, P185, o cualquier combinación de los mismos (es decir, se contemplan mutantes simples, mutantes dobles y mutantes triples). Los ejemplos adecuados incluyen, sin limitación, HlgA<sup>LukS-DR4</sup> (es decir, la SEQ ID NO: 13), HlgA<sub>20-258</sub><sup>LukS-DR4</sup> (es decir, la SEQ ID NO: 14) y HlgA<sup>P182A, G184A, P185A</sup> (es decir, la SEQ ID NO: 15, que se muestra a continuación).

10

## ES 2 811 527 T3

```

Glu Asn Lys Ile Glu Asp Ile Gly Gln Gly Ala Glu Ile Ile Lys Arg
1          5          10          15
Thr Gln Asp Ile Thr Ser Lys Arg Leu Ala Ile Thr Gln Asn Ile Gln
20          25          30
Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Val Val
35          40          45
Lys Met Gln Gly Phe Ile Ser Ser Arg Thr Thr Tyr Ser Asp Leu Lys
50          55          60
Lys Tyr Pro Tyr Ile Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile
65          70          75          80
Ser Leu Lys Thr Lys Asp Ser Asn Val Asp Leu Ile Asn Tyr Leu Pro
85          90          95
Lys Asn Lys Ile Asp Ser Ala Asp Val Ser Gln Lys Leu Gly Tyr Asn
100         105         110
Ile Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Ser Gly Ser
115         120         125
Phe Asn Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Asn Tyr Val Thr
130         135         140
Glu Val Glu Ser Gln Asn Ser Lys Gly Val Lys Trp Gly Val Lys Ala
145         150         155         160
Asn Ser Phe Val Thr Pro Asn Gly Gln Val Ser Ala Tyr Asp Gln Tyr
165         170         175
Leu Phe Ala Gln Asp Ala Thr Ala Ala Ala Ala Arg Asp Tyr Phe Val
180         185         190
Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Ile Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser
195         200         205
Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Arg Gly Lys Gly Asp Lys Ser Glu
210         215         220
Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn Met Asp Ala Thr Tyr Ala Tyr Val
225         230         235         240
Thr Arg His Arg Leu Ala Val Asp Arg Lys His Asp Ala Phe Lys Asn
245         250         255
Arg Asn Val Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn Trp Lys Thr His Glu Val
260         265         270
Lys Ile Lys Ser Ile Thr Pro Lys
275         280

```

- 5 La composición puede comprender además una proteína HlgB aislada o un polipéptido de la misma. La proteína HlgB aislada puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 como se muestra a continuación o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de similitud de secuencia con la SEQ ID NO: 16 (secuencia de aminoácidos de HlgB).

## ES 2 811 527 T3

Glu Gly Lys Ile Thr Pro Val Ser Val Lys Lys Val Asp Asp Lys Val  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Tyr Lys Thr Thr Ala Thr Ala Asp Ser Asp Lys Phe Lys Ile  
 20 25 30  
 Ser Gln Ile Leu Thr Phe Asn Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr Asp Lys  
 35 40 45  
 Asp Thr Leu Val Leu Lys Ala Thr Gly Asn Ile Asn Ser Gly Phe Val  
 50 55 60  
 Lys Pro Asn Pro Asn Asp Tyr Asp Phe Ser Lys Leu Tyr Trp Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Lys Tyr Asn Val Ser Ile Ser Ser Gln Ser Asn Asp Ser Val Asn Val  
 85 90 95  
 Val Asp Tyr Ala Pro Lys Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln Asn  
 100 105 110  
 Thr Leu Gly Tyr Thr Phe Gly Gly Asp Ile Ser Ile Ser Asn Gly Leu  
 115 120 125  
 Ser Gly Gly Leu Asn Gly Asn Thr Ala Phe Ser Glu Thr Ile Asn Tyr  
 130 135 140  
 Lys Gln Glu Ser Tyr Arg Thr Thr Leu Ser Arg Asn Thr Asn Tyr Lys  
 145 150 155 160  
 Asn Val Gly Trp Gly Val Glu Ala His Lys Ile Met Asn Asn Gly Trp  
 165 170 175  
 Gly Pro Tyr Gly Arg Asp Ser Phe His Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu  
 180 185 190  
 Phe Leu Ala Gly Arg Gln Ser Ser Ala Tyr Ala Gly Gln Asn Phe Ile  
 195 200 205  
 Ala Gln His Gln Met Pro Leu Leu Ser Arg Ser Asn Phe Asn Pro Glu  
 210 215 220  
 Phe Leu Ser Val Leu Ser His Arg Gln Asp Gly Ala Lys Lys Ser Lys  
 225 230 235 240  
 Ile Thr Val Thr Tyr Gln Arg Glu Met Asp Leu Tyr Gln Ile Arg Trp  
 245 250 255  
 Asn Gly Phe Tyr Trp Ala Gly Ala Asn Tyr Lys Asn Phe Lys Thr Arg  
 260 265 270  
 Thr Phe Lys Ser Thr Tyr Glu Ile Asp Trp Glu Asn His Lys Val Lys  
 275 280 285  
 Leu Leu Asp Thr Lys Glu Thr Glu Asn Asn Lys  
 290 295

- 5 Los polipéptidos HlgB adecuados tienen una longitud de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 aminoácidos, más preferiblemente entre aproximadamente 100-200 aminoácidos de longitud o entre aproximadamente 200-250 aminoácidos de longitud. Los polipéptidos HlgB adecuados también incluyen aquellos polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente un 70-80% de similitud de secuencia, preferiblemente un 80-90% de similitud de secuencia, más preferiblemente un 90-95% de similitud de secuencia, y lo más preferiblemente un 95-99% de similitud de secuencia con los residuos de aminoácido 1-286 de la SEQ ID NO: 16.

10 Se describe también un método para prevenir o tratar la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en un sujeto. Este método implica seleccionar un sujeto en riesgo de tener o que tiene infección por VIH y administrar, al sujeto seleccionado, una composición que comprende una proteína Luke aislada o un polipéptido de la misma que tiene un dominio de unión a CXCR1/CXCR2 no funcional en condiciones efectivas para prevenir o tratar el VIH en el sujeto. La composición puede contener además una proteína LukD aislada o un polipéptido de la misma como se describió anteriormente. La composición también puede contener una cualquiera o más sustituciones o eliminaciones

a la proteína o polipéptido LukE en la que existen los aminoácidos P184, G186, P187 y/o G189, como se describió anteriormente.

5 Como se describe en este documento y en otros lugares (véase la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20130039885 de Torres et al.), CCR5 también es un receptor celular para la toxina LukE de *S. aureus*. La unión de LukED a células positivas para CCR5 provoca la formación de poros y provoca la muerte celular. Se sabe que el receptor de CCR5 media la entrada y la infectividad a la célula del VIH; por lo tanto, tratar a un sujeto que tiene VIH con una composición que comprende proteínas o polipéptidos LukE y LukD causará la muerte celular de todas las células positivas para el VIH. Este método de tratamiento es superior a las estrategias terapéuticas actuales contra el VIH porque el tratamiento con LukED agotará selectiva y específicamente todas las células positivas para CCR5 y, por lo tanto, todas las células positivas para VIH en un sujeto. La composición de la presente invención que comprende una "proteína o polipéptido LukE modificado", es decir, una proteína o polipéptido LukE que tiene un dominio de unión al receptor CXCR1/CXCR2 no funcional, tiene una especificidad mejorada para tratar el VIH y otras indicaciones descritas en el presente documento, porque no se evita el ataque no específico y la muerte celular de las células positivas para CXCR1/CXCR2, incluidos los PMN, es decir, las composiciones que comprenden la proteína o polipéptido LukE modificado de la presente invención son altamente selectivas para las células CCR5+.

10 Las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden administrarse como parte de una terapia de combinación junto con otro agente anti-VIH. Por consiguiente, la composición que comprende una proteína LukE aislada, o un polipéptido de la misma que tiene un dominio de unión a CXCR1/CXCR2 no funcional, y una proteína LukD aislada, o un polipéptido de la misma, puede comprender o administrarse en combinación con uno o más agentes antivirales u otros agentes útiles en el tratamiento del VIH. Los agentes antivirales adecuados incluyen inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósidos, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos e inhibidores de la proteasa. Más específicamente, los agentes antivirales adecuados incluyen, sin limitación, zidovudina, lamivudina, zalcitabina, didanosina, estavudina, abacavir, adefovir dipivoxil, lobucavir, BC H-10652, emitricitabina, beta-L-FD4, DAPD, lodenosina, nevirapina, delaviridina, efavirenz, PNU-142721, AG-1549, MKC-442, (+)-calanolida A y B, saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, lasinavir, DMP-450, BMS-2322623, ABT-378, amprenavir, hidroxiurea, ribavirina, IL-2, IL-12, pentafusida, Yissum No. 11607 y AG-1549.

15 Para los propósitos de este aspecto de la invención, el "sujeto" objetivo abarca cualquier animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. En el contexto de administrar una composición de la invención con el fin de prevenir la infección por VIH en un sujeto, el sujeto objetivo abarca cualquier sujeto que esté en riesgo de infectarse por el VIH. En el contexto de administrar una composición de la invención con el propósito de tratar la infección por VIH en un sujeto, el sujeto objetivo abarca cualquier sujeto infectado con VIH.

20 En el contexto del uso de composiciones terapéuticas de la presente invención para tratar una infección por VIH, una cantidad terapéuticamente efectiva de LukE y LukD modificada es aquella cantidad capaz de lograr una reducción en los síntomas asociados con la infección, una disminución en la gravedad de al menos un síntoma, una disminución en la carga viral del sujeto, y preferiblemente una erradicación completa del virus del sujeto.

25 Las cantidades terapéuticamente efectivas de una composición que contiene LukE y LukD modificadas 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 VIH a tratar (o prevenir) y los detalles del sujeto, tales como la edad, el peso y la salud general y el estado inmunitario. Se puede encontrar orientación general, por ejemplo, en las publicaciones de la Conferencia Internacional sobre Armonización y en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE (Mack Publishing Company 1990). Un médico puede administrar una composición que contenga las proteínas o polipéptidos LukE y LukD modificados, 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 (por ejemplo, carga viral).

30 Las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden administrarse en una dosis única, o de acuerdo con un protocolo de dosificación múltiple. Por ejemplo, en un protocolo de dosificación múltiple, la composición terapéutica se puede administrar una o dos veces al día, semanalmente o mensualmente, dependiendo del uso y la gravedad de la afección que se esté tratando. Un experto en la materia puede seleccionar y ajustar diferentes dosis, tiempos de dosificación y cantidades relativas de la composición terapéutica. Los modos de administración de las composiciones terapéuticas de la presente invención se describen a continuación.

35 Un método para prevenir la infección por VIH de un sujeto implica proporcionar una composición que comprende una proteína o polipéptido LukE aislado que tiene un dominio de unión al receptor CXCR1/CXCR2 no funcional, y, opcionalmente, una proteína o polipéptido LukD aislado, y poner en contacto el tejido del sujeto con la composición en condiciones efectivas para bloquear la infectividad por el VIH de las células en el tejido, inhibiendo así la infección por VIH del sujeto.

40 La composición que comprende las proteínas o polipéptidos LukE y LukD modificados sirve como un microbicida anti-VIH, matando selectivamente solo las células CCR5+ que son susceptibles a la infección por VIH antes de que la

infección ocurra sin atacar de forma no específica a las células CXCR1/CXCR2<sup>+</sup>. La composición puede administrarse a cualquier sujeto femenino o masculino que esté en riesgo de exposición al VIH como un medio profiláctico para prevenir la infección por VIH.

5 La composición que comprende las proteínas o polipéptidos LukE y LukD modificados puede comprender además uno o más agentes adicionales. El uno o más agentes adicionales incluyen, por ejemplo, y sin limitación, un lubricante, un agente antimicrobiano, un antioxidante, un humectante, un emulsionante, un agente espermicida o una mezcla de dos o más de los mismos.

10 Los lubricantes adecuados incluyen, sin limitación, cera de ésteres de cetilo, aceite vegetal hidrogenado, estearato de magnesio, estearato de metilo, aceite mineral, copolímero de polioxietileno-polioxipropileno, polietilenglicol, alcohol polivinílico, lauril sulfato de sodio o cera blanca, o una mezcla de dos o más de los mismos. Los agentes antimicrobianos adecuados incluyen, sin limitación, propilenglicol, metilparabeno o propilparabeno, o una mezcla de dos o más de los mismos. Los antioxidantes adecuados incluyen, sin limitación, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno  
15 butilado o edetato disódico, o una mezcla de dos o más de los mismos. Los humectantes adecuados incluyen, sin limitación, etilenglicol, glicerina o sorbitol, o una mezcla de dos o más de los mismos. Los emulsionantes adecuados incluyen, sin limitación, carbómero, polioxietileno-10-estearil éter, polioxietileno-20-estearil éter, alcohol cetosteárico, alcohol cetílico, colesterol, estearato de diglicol, monoestearato de glicerilo, estearato de glicerilo, hidroxipropil  
20 celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, lanolina, polioxietileno lauril éter, metilcelulosa, estearato de polioxietileno, polisorbato, monoestearato de propilenglicol, ésteres de sorbitán o ácido esteárico, o una mezcla de dos o más de los mismos.

En una realización de la invención, la composición microbicida se formula para aplicación tópica. Las composiciones para administración tópica de acuerdo con la presente invención pueden formularse como soluciones, pomadas,  
25 cremas, espumas, suspensiones, lociones, polvos, pastas, geles, atomizadores, aerosoles o aceites para administración vaginal, anal o bucal. En otra realización de la invención, la composición está formulada para administración vaginal y/o rectal. En otra realización de la invención, la composición está formulada para la liberación lenta de un dispositivo vaginal, tal como un anillo vaginal, un DIU o una esponja u otro dispositivo anticonceptivo (por ejemplo, condón). En otra realización más de la presente invención, la composición se formula para aplicación como un enjuague oral. En una realización preferida de la invención, la composición se aplica o se pone en contacto  
30 directamente con la piel o una membrana mucosa del sujeto que está en riesgo de exponerse a la infección por VIH.

Se describe también un método para tratar una afección inflamatoria en un sujeto. Este método implica seleccionar un sujeto que tiene una afección inflamatoria y administrar una composición de la presente invención que comprende una  
35 proteína o polipéptido LukE aislado que tiene un dominio de unión al receptor CXCR1/CXCR2 no funcional y, opcionalmente, una proteína o polipéptido LukD aislado, en un cantidad efectiva para tratar la condición inflamatoria en el sujeto.

Los solicitantes han descubierto que LukED ataca y mata los leucocitos humanos positivos para CCR5. Las composiciones que comprenden una proteína o polipéptido LukE que tiene un dominio de unión al receptor CXCR1/CXCR2 no funcional dirigen selectiva y específicamente la citotoxicidad mediada por LukED a células CCR5<sup>+</sup> pero no a otras células de mamífero nucleadas. Dado que CCR5 se expresa en un subconjunto de células T efectoras que producen citocinas proinflamatorias que se enriquecen localmente durante la inflamación, las composiciones de la presente invención que comprenden las proteínas y polipéptidos LukE y LukD modificados son útiles para tratar  
45 afecciones inflamatorias al agotar selectivamente las poblaciones de células positivas para CCR5. Cualquier sujeto, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, puede tratarse de acuerdo con este aspecto de la invención, independientemente de la causa de la inflamación, por ejemplo, cualquier infección bacteriana o viral. Las composiciones adecuadas que contienen las proteínas y/o polipéptidos LukE y LukD modificados se describen más arriba.

50 Las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden usarse para tratar una serie de afecciones inflamatorias, que incluyen pero no se limitan a afecciones inflamatorias agudas, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, psoriasis, colitis ulcerosa, artritis psoriásica, esclerosis múltiple, lupus, diabetes tipo I, cirrosis biliar primaria, enfermedad inflamatoria intestinal, tuberculosis, heridas e infecciones cutáneas, abscesos tisulares, foliculitis, osteomielitis, neumonía, síndrome de piel escaldada, septicemia, artritis séptica, miocarditis, endocarditis, síndrome de choque tóxico, dermatitis alérgica de contacto, hipersensibilidad aguda y lesión inflamatoria neurológica aguda (por ejemplo, causada por una infección aguda).

60 Las condiciones inflamatorias agudas abarcan la respuesta inicial del cuerpo a los estímulos invasores, e implican el reclutamiento de plasma y glóbulos blancos (leucocitos) en el área localizada de los tejidos lesionados o infectados. Las afecciones inflamatorias agudas tienen un inicio rápido y síntomas graves. La duración del inicio, desde una condición normal del paciente hasta una en la que los síntomas de inflamación se manifiestan gravemente, generalmente dura hasta aproximadamente 72 horas. Las afecciones inflamatorias agudas que son susceptibles de tratamiento con las composiciones terapéuticas de la presente invención incluyen conjuntivitis, iritis, uveítis, retinitis central, otitis externa, otitis media supurativa aguda, mastoiditis, laberintitis, rinitis crónica, rinitis aguda, sinusitis, faringitis, amigdalitis, dermatitis de contacto, dermonecrosis, polineuritis diabética, polimiositis, miositis osificante,  
65

artritis degenerativa, artritis reumatoide, periartrosis escapulo-humeral y osteítis deformante. En una realización, la afección inflamatoria aguda es una herida infectada en la piel o tejido blando.

5 En el contexto del tratamiento de una afección inflamatoria, una cantidad efectiva de una composición de Luke/LukD modificada es la cantidad que es terapéuticamente efectiva en el sentido de que el tratamiento es capaz de lograr una reducción de la inflamación, una disminución de la gravedad de la inflamación, o incluso un alivio total de la condición inflamatoria.

10 Las composiciones antiinflamatorias de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía de administración como se describe más adelante. En el caso del tratamiento de afecciones inflamatorias agudas que están localizadas, puede preferirse la administración no sistémica, en cuyo caso la administración de la composición terapéutica es en o alrededor del sitio de la inflamación aguda. A este respecto, se prefieren las composiciones para administración tópica. Además de las formulaciones tópicas descritas anteriormente, la formulación tópica también puede estar en forma de parches o apósitos impregnados con un ingrediente o ingredientes activos, que opcionalmente pueden comprender uno o más excipientes o diluyentes. En algunas realizaciones, la formulación tópica incluye un material que mejora la absorción o penetración del agente o los agentes activos a través de la piel u otras áreas afectadas.

15 Una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de Luke/LukD modificada de acuerdo con este y otros aspectos de la invención es la cantidad necesaria para obtener resultados beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad terapéuticamente efectiva en una o más administraciones, aplicaciones o dosis y no se pretende que se limite a una formulación o ruta de administración particular.

20 La composición de Luke/LukD modificada se puede administrar en combinación con (es decir, antes, junto con, o después de), otras composiciones antiinflamatorias, un inhibidor de TNF $\alpha$  o una combinación de los mismos. Los ejemplos de medicamentos antiinflamatorios incluyen, pero no se limitan a, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), analgésicos, glucocorticoides, medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad, inhibidores de dihidrofolato reductasa (por ejemplo, metotrexato), modificadores de la respuesta biológica y cualquier combinación de los mismos.

25 Un AINE adecuado es un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Los ejemplos de inhibidores de COX-2 incluyen, sin limitación, nimesulida, 4-hidroxinimesulida, flosulida, meloxicam, celecoxib y Rofecoxib (Vioxx). Alternativamente, se administra un inhibidor de AINE no selectivo en combinación con la composición de Luke/D de la presente invención. Los ejemplos de inhibidores de AINE no selectivos incluyen, sin limitación, diclofenaco, diflunisal, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolac, ácido mefenámico, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, salsalato, sulindac y tolmetina.

30 Los analgésicos preferidos incluyen, sin limitación, acetaminofén, oxicodona, tramadol y clorhidrato de propoxifeno.

35 Los glucocorticoides preferidos incluyen, sin limitación, cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona y prednisona.

Los modificadores de respuesta biológica preferidos incluyen un inhibidor de células B, tal como Rituximab, o un inhibidor de activación de células T, tal como Leflunomida, Etanercept (Enbrel) o Infliximab (Remicade).

40 Los inhibidores de TNF $\alpha$  adecuados incluyen un anticuerpo TNF- $\alpha$ , un inhibidor de metaloproteínasa de matriz, un corticosteroide, un antagonista de TNF $\alpha$  de tetraciclina, un antagonista de TNF $\alpha$  de fluoroquinolona y un antagonista de TNF $\alpha$  de quinolona. Los ejemplos de anticuerpos antagonistas de TNF $\alpha$  incluyen, sin limitación, infliximab, etanercept, CytoFab, AGT-1, afelimomab, PassTNF y CDP-870. Los ejemplos de corticosteroides incluyen, sin limitación, mometasona, fluticasona, ciclesonida, budesonida, beclometasona, Beconasa, flunisolida, deflazacort, betametasona, metilprednisolona, dexametasona, prednisolona, hidrocortisona, cortisol, triamcinolona, cortisona, corticosterona, dihidroxicortisona, dipropionato de beclometasona, y prednisona. Los ejemplos de antagonistas de TNF- $\alpha$  de tetraciclina incluyen, sin limitación, doxiciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, limeciclina y 4-hidroxi-4-dimetilaminotetraciclina.

45 También se describe un método para prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) en un sujeto. Este método implica seleccionar un sujeto que tenga o corra el riesgo de tener EICH, y administrar una composición que comprende una proteína o polipéptido Luke aislado que tiene un dominio de unión al receptor CXCR1/CXCR2 no funcional y, opcionalmente, una proteína o polipéptido LukD aislado, en una cantidad eficaz para prevenir la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) en el sujeto.

50 La enfermedad de injerto contra huésped (EICH) sigue siendo la principal complicación del trasplante clínico de médula ósea (TMO) y un impedimento importante para la aplicación generalizada de esta importante modalidad terapéutica. El sello distintivo de la EICH es la infiltración de linfocitos T de donantes en los compartimentos epiteliales del huésped de la piel, el intestino y el tracto biliar. La EICH ocurre cuando las células T maduras, contenidas en la médula ósea del injerto, se trasplantan a huéspedes inmunosuprimidos. Después del trasplante, las células presentadoras de antígeno (CPA) del huésped activan las células T del injerto (células T del donante) al presentar antígenos de

histocompatibilidad del huésped a las células T del injerto. Las CPA derivadas de donantes también pueden activar células T del donante mediante aloantígenos del huésped que presentan cruces. Las poblaciones efectoras T específicas del huésped (eTeh) recientemente generadas migran luego a los órganos periféricos del huésped y causan daño a los órganos objetivo.

5 La EICH generalmente ocurre en forma aguda y crónica. La EICH aguda se observará dentro de los primeros 100 días después del TMO, mientras que la EICH crónica ocurre después de estos primeros 100 días. Además de la cronología, también se manifiestan diferentes síntomas clínicos en la EICH aguda versus la EICH crónica. La EICH aguda generalmente se caracteriza por daño al hígado del huésped, la piel, la mucosa y el epitelio intestinal en el sujeto huésped, aunque también se han informado algunas formas de neumonía idiopática. La EICH crónica, por otro lado, está asociada con el daño al tejido conectivo, así como a los órganos y tejidos dañados durante la EICH aguda en el sujeto huésped. En general, los métodos se relacionan con terapias para abordar la EICH que ya está presente en un sujeto huésped o para evitar que la EICH surja en un sujeto huésped. Una realización se refiere a métodos para tratar o prevenir la EICH aguda. En particular, los métodos son adecuados para tratar la EICH aguda en la que la EICH daña el epitelio intestinal del huésped. Los métodos también son adecuados para tratar la EICH aguda en la que la EICH daña al menos un tejido seleccionado del grupo que consiste en el hígado del huésped, la piel del huésped, el pulmón del huésped y la mucosa del huésped. Por supuesto, los métodos se pueden usar para tratar la EICH aguda en la que la EICH daña más de un tejido.

20 Las células T donantes positivas para CCR5 trasplantadas en el huésped receptor durante el trasplante alogénico median la EICH. Por consiguiente, en una realización, las células de la médula ósea del donante se tratan con una composición que contiene Luke/LukD modificado antes del trasplante para efectuar la muerte celular de todas las células CCR5+, evitando así la EICH.

25 El tratamiento de las células de la médula ósea del donante se logra tratando el injerto. El término "tratamiento del injerto" significa administrar una composición o realizar un procedimiento al material del injerto, en el que el tratamiento no pretende afectar directamente al organismo huésped. Por supuesto, el tratamiento exitoso del injerto afectará indirectamente al organismo huésped, ya que la gravedad de la EICH puede reducirse o incluso eliminarse por completo. Los métodos no se limitan a la ubicación del injerto en el momento en que se trata. Por lo tanto, en una realización, el injerto se trata antes de retirarlo del organismo del donante. En otra realización, el injerto se trata después de retirarlo del organismo del donante. En otra realización más, el injerto se trata después de la extracción del organismo del donante, pero antes del trasplante en el sujeto huésped. En otra realización más, el injerto se trata después del trasplante en el organismo huésped.

35 La composición que comprende Luke y LukD modificados puede administrarse como parte de una terapia de combinación. Por ejemplo, la composición de Luke/LukD puede administrarse conjuntamente con otra sustancia farmacéuticamente activa, tal como, pero sin limitarse a, metotrexato y ciclosporina. Los agentes adicionales que pueden administrarse conjuntamente incluyen, entre otros, anticuerpos dirigidos a diversos objetivos, tacrolimus, sirolimus, interferones, opioides, TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral-alfa), proteínas de unión, micofenolato mofetilo y otros inhibidores de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), glucocorticoides, azatioprina y otros agentes citostáticos tales como, pero sin limitarse a, antimetabolitos y agentes alquilantes. En una realización, el injerto o el donante pueden tratarse previamente mediante la administración de fármacos inmunosupresores tales como ciclosporina (solo o en combinación con esteroides) y metotrexato antes del trasplante. Para la prevención, la terapia inmunosupresora generalmente consiste en regímenes combinados de metotrexato (MTX), ciclosporina (CsA), tacrolimus (FK 506) y/o un corticosteroide. También se ha demostrado que las preparaciones intravenosas de gammaglobulina administradas profilácticamente son beneficiosas para la prevención de la EICH. Además, la pentoxifilina, un derivado de xantina capaz de subregular la producción de TNF $\alpha$ , puede administrarse con ciclosporina más metotrexato o metilprednisolona para disminuir aún más la incidencia de EICH. La EICH crónica puede tratarse con esteroides tales como prednisona, ozotioprina y ciclosporina. Además, se puede usar globulina antitímocítica (ATG) y/o ursodiol. La talidomida con propiedades inmunosupresoras ha mostrado resultados prometedores en el tratamiento de la EICH crónica. Similar a la talidomida, la clofazimina también puede coadministrarse con la composición de la presente invención que comprende Luke y LukD. Los objetivos de anticuerpos para anticuerpos administrados conjuntamente incluyen, pero no se limitan a, receptor de células T (TCR), interleucina-2 (IL-2) y receptores de IL-2. Además, un anticuerpo monoclonal CD(25), un anticuerpo monoclonal anti-CD8 o un anticuerpo anti-CD103 pueden administrarse conjuntamente para la profilaxis de la EICH.

60 También se describe un método para prevenir o tratar el cáncer en un sujeto. Este método implica seleccionar un sujeto que tenga o corra el riesgo de tener cáncer y administrar, al sujeto seleccionado, una composición que comprende una proteína o polipéptido Luke aislado que tiene un dominio de unión al receptor CXCR1/CXCR2 no funcional y, opcionalmente, una proteína o polipéptido LukD aislado, en una cantidad efectiva para tratar o prevenir el cáncer en el sujeto.

65 Los cánceres adecuados para el tratamiento incluyen aquellos cánceres, formas primarias y metastásicas, en los que CCR5 juega un papel en la mediación del desarrollo o la progresión del cáncer y en los que el antagonismo de CCR5 tiene implicaciones terapéuticas beneficiosas. Por ejemplo, los cánceres adecuados incluyen, sin limitación, cáncer de hígado (Ochoa-Callejero et al., "Maraviroc, a CCR5 Antagonist, Prevents Development of Hepatocellular Carcinoma

in a Mouse Model", PLOS One 8(1): e53992 (2013)), cáncer de mama (Velasco-Velazquez et al., "The CCL5/CCR5 Axis Promotes Metastasis in Basal Breast Cancer", Oncoimmunology 2(4): e23660 (2013) y Velasco-Velazquez et al., "CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells", Cancer Res. 72:3839 (2012)), cáncer de pulmón (Lee et al., "Deficiency of C-C Chemokine Receptor 5 Suppresses Tumor Development Via Inactivation of NF- $\kappa$ B and Inhibition of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Urethane-Induced Lung Tumor Model", Carcinogenesis 33(12): 2520-2528 (2012)), y cáncer de próstata (Zhang et al., "Structure Activity Relationship Studies of Natural Product Chemokine Receptor CCR5 Antagonist Anibamine Toward the Development of Novel Anti-Prostate Cancer Agents", Eur. J. Medicinal Chem. 55: 395-408 (2012)).

La administración de una composición que comprende LukE y LukD modificados a un sujeto para atacar las células cancerosas CCR5+ se puede llevar a cabo simultáneamente con otros enfoques terapéuticos contra el cáncer, es decir, la composición se administra como parte de una terapia de combinación. Por consiguiente, en una realización, el agente se administra en combinación con una o más terapias contra el cáncer adicionales tales como, una quimioterapia, radiación (por ejemplo, radioterapia de haz externo o braquiterapia), o una terapia antiangiogénica.

Los agentes quimioterapéuticos adecuados para terapias de combinación incluyen, sin limitación, agentes alquilantes (por ejemplo, clorambucilo, ciclofosfamida, CCNU, melfalan, procarbazona, tiotepa, BCNU y busulfán), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina y 5-fluorouracilo), antraciclinas (daunorrubicina, doxorubicina, idarrubicina, epirubicina, y mitoxantrona), antibióticos antitumorales (por ejemplo, bleomicina, anticuerpos monoclonales (por ejemplo, Alemtuzumab, Bevacizumab, Cetuximab, Gemtuzumab, Ibritumomab, Panitumumab, Rituximab, Tositumomab, y Trastuzumab), compuestos de platino (por ejemplo, cisplatino y oxaliplatino) o alcaloides vegetales (por ejemplo, inhibidores de topoisomerasa, alcaloides de la vinca, taxanos y epipodofilotoxinas).

Las terapias antiangiogénicas adecuadas para su uso en un enfoque de terapia de combinación con las composiciones de la presente invención incluyen, sin limitación, un inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inhibidor del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), antagonista del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), antagonista del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), antagonista del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), antagonista del receptor de angiopoyetina (Tie-2), antagonista del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB), o cualquier combinación de los mismos. Se conocen varios inhibidores angiogénicos adecuados de molécula pequeña en la técnica o están en desarrollo clínico (véase, por ejemplo, Wu et al., "Anti-Angiogenic Therapeutic Drugs for the Treatment of Human Cancer", J Cancer Molecules 4(2): 37-45 (2008)). Estos inhibidores angiogénicos incluyen, sin limitación, Gefitinib (un inhibidor de ErbB), Lapatinib (un inhibidor dual de ErbB1/ErbB2), Erlotinib, Canertinib (un inhibidor de pan-ErbB), Vatalanib (inhibidor del receptor de VEGF), Imatinib (inhibidor multiobjetivo de Bcr-Abl, c-kit e inhibidor de PDGF-R), Sunitinib (inhibidor multiobjetivo de VEGFR, PDGFR Kit, Flt3, Tet e inhibidor de CSF1R), Sorafenib (inhibidor multiobjetivo de VEGFR y PDGFR), Pazopanib (un inhibidor multiobjetivo de VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGF- $\alpha$ , PDGF- $\beta$  y c-kit). Alternativamente, el agente terapéutico anti-vasculogénico es un anticuerpo monoclonal. Los agentes terapéuticos de anticuerpos adecuados incluyen, sin limitación, Bevacizumab (anticuerpo de VEGF), IMC-1C11 (anticuerpo de VEGFR-2), mF4-31C1 (anticuerpo de VEGFR-3) y Vitaxin (anticuerpo de integrina  $\alpha_v\beta_3$ ).

También se describe un método para identificar un compuesto capaz de prevenir o tratar la infección por *S. aureus* y/o afecciones resultantes de una infección por *S. aureus*. Este método se lleva a cabo típicamente *in vitro*, es decir, en cultivo celular. Este método implica proporcionar una colección de compuestos candidatos y proporcionar una población de células que expresan CXCR1, CXCR2 y/o DARC humanos. El método implica además tratar la población de células con un agente capaz de inducir citotoxicidad mediada por LukED o HlgAB, y poner en contacto la población de células tratadas con uno o más compuestos candidatos de la colección. El método implica además medir el nivel de citotoxicidad mediada por LukED o HlgAB en la población de células tratadas en presencia y ausencia de uno o más compuestos candidatos y comparar el nivel medido de citotoxicidad mediada por LukED o HlgAB en presencia y en ausencia de uno o más compuestos candidatos. Una disminución en el nivel de citotoxicidad mediada por LukED o HlgAB en presencia de uno o más compuestos candidatos en comparación con la ausencia de uno o más compuestos candidatos identifica un compuesto capaz de prevenir o tratar una infección por *S. aureus* y/o una afección resultante de una infección por *S. aureus*.

Las células que expresan CXCR1/CXCR2 humano que son adecuadas para su uso de acuerdo con este aspecto incluyen PMN humanos, monocitos, células asesinas naturales, subconjuntos de células T CD8+, células epiteliales y células endoteliales. Las células que expresan DARC humano que son adecuadas para su uso de acuerdo con este aspecto incluyen células endoteliales humanas y glóbulos rojos. Otras células adecuadas incluyen cualquier célula nucleada que ha sido modificada para expresar CXCR1/CXCR2 o DARC, por ejemplo, células transfectadas de manera estable o transitoria con un constructo de expresión que contiene una secuencia de polinucleótidos de CXCR1, CXCR2 y/o DARC humana.

Como se describe en este documento, este método está diseñado para identificar agentes que inhiben algún aspecto de la cascada de eventos que conduce a la citotoxicidad mediada por LukED o HlgAB y la lisis de células CXCR1/CXCR2+ o DARC+ humanas. Los eventos dirigidos que forman parte de la cascada incluyen, por ejemplo, la unión de LukE o HlgA a CXCR1/CXCR2 o DARC, la oligomerización de LukED o HlgAB, y la formación de poros de membrana por el oligómero de LukED o HlgAB. El ensayo utiliza cualquier célula de mamífero o no mamífero que

- expresa el CXCR1/CXCR2 o DARC humano que comprende el dominio de unión a Luke y HlgA, medio de cultivo adecuado y Luke/LukD y HlgA/HlgB aislados o recombinantes o *S. aureus*. El ensayo incluye además un marcador etiquetado de citotoxicidad que se expone a las células antes, durante o después de que las células que expresan CXCR1/CXCR2 o DARC humano se pongan en contacto con un agente capaz de inducir citotoxicidad por LukED o HlgAB. El marcador etiquetado de citotoxicidad puede comprender un colorante de viabilidad celular, un colorante impermeable a las células y/o un indicador de lisis celular. Los ejemplos de protocolos de selección adecuados para su uso de acuerdo con este aspecto se describen en detalle en la solicitud internacional de patente serie No. PCT/US2013/032436 de Torres et al.).
- 5 Ejemplos
- Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar realizaciones de la presente invención, pero de ninguna manera pretenden limitar su alcance.
- 15 Materiales y métodos para los ejemplos 1-8
- Condiciones de cultivo celular y transducciones virales. Las células humanas primarias y THP-1 se cultivaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS; Atlanta Biologicals) y penicilina (100 U mL<sup>-1</sup>) y estreptomycin (0,1 mg mL<sup>-1</sup>) (Mediatech) a menos que se indique lo contrario. La sobreexpresión y la desactivación de base lentiviral de *Cxcr2* o ARNph no objetivo se realizaron como se describió previamente (Wan et al., "Cytokine Signals Through PI-3 Kinase Pathway Modulate Th17 Cytokine Production by CCR6+ Human Memory T Cells", *J. Exp. Med.* 208: 1875-1887 (2011)) y se mantuvo en 1,3 µg mL<sup>-1</sup> de puromicina. Las células HEK293T se cultivaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en DMEM (Cellgro) y se suplementaron como se describió anteriormente.
- 20 Aislamiento de PBMC. Se obtuvo sangre como capas leucocitarias con el consentimiento de donantes no identificados del Centro de Sangre de Nueva York. Las PBMC se aislaron de la sangre usando un gradiente Ficoll-Paque PLUS (GE Amersham) y se bloquearon en células CCR5<sup>+</sup>, seguido anti-CD3 y tinción de la superficie de las células CD14 para poblaciones de linfocitos y monocitos. Las células fueron incubadas luego con LukED (75 nM) en presencia o ausencia de maraviroc (MVC, 100 ng mL<sup>-1</sup>).
- 25 Inhibidores de CCR5 y ligandos. Maraviroc se obtuvo a través del Programa de Investigación y Reactivos de Referencia del SIDA, División de SIDA (NIAID, NIH) y se usó a una concentración final de 100 ng mL<sup>-1</sup>. CXCL8 y CXCL1 se obtuvieron de BioLegend y se usaron a las concentraciones indicadas en el texto.
- 30 Análisis por FACS. La tinción celular se realizó como se describió anteriormente (Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED", *Nature* 493: 51-55 (2013)). Los datos de FACS se obtuvieron utilizando el software FACSDiva en un citómetro de flujo LSRII (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el software FlowJo (Treestar).
- 35 Anticuerpos y colorantes. Los anticuerpos utilizados para la tinción de la superficie de las células humanas primarias incluyeron los siguientes: CXCR1-APC (clon 8F1/CXCR1), CXCR2-PE (clon 5E8/CXCR2), CD3-PE-Cy7 (clon UCHT1), CD8-Pacific Blue (clon HIT8a), CD14-Alexa Fluor 700 (clon HCD14), CD16-Alexa Fluor 488 (clon 3G8), CD56-PerCP-Cy5.5 (clon HCD56), CD19-Violeta Brillante 650 (clon HIB19), HLA-DR-Violeta Brillante 605 (clon L243), CD14-FITC (clon M5E2), CD18-PE-Cy5 (clon TS1/18) (BioLegend) y CCR5-PE (clon 2D7) (BD Pharmingen).
- 40 Los anticuerpos utilizados para la tinción superficial de células murinas primarias incluyeron los siguientes: CXCR2-AF647 (clon TG11/CXCR2) (BioLegend), CCR5-PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen), estreptavidina-PerCP-Cy5.5 (BioLegend), CD11b-PE (clon M1/70) (BD Pharmingen), B220-Alexa700 (clon RA3-6B2) (BioLegend), Ly6G-FITC (clon 1A8) (BD Biosciences), F480-PECy7 (clon BM8) (BioLegend) y CD16/CD32 Fc Block (clon 2.4G2) (BD Biosciences). Los colorantes de viabilidad fijables eFluor-450 y eFluor 780 fueron adquiridos de eBioscience.
- 45 Generación de constructos *lukE<sup>DR</sup>*. Las cepas mutantes de DR isogénicas se generaron mediante PCR solapada (véanse las Tablas 1-3 a continuación para obtener información detallada sobre cebadores y cepas). Para generar *lukE<sup>DR1</sup>*, se usó el plásmido de VJT8.87 que contiene *lukE* se usó como plantilla y se amplificó con los cebadores VJT296 y VJT891; VJT297 y VJT894; o VJT892 y VJT893. Para *lukE<sup>DR2</sup>*, se usó el plásmido de VJT8.87 que contiene *lukE* como plantilla y se amplificó con los cebadores VJT296 y VJT895; VJT898 y VJT297; o VJT896 y VJT897. Para *lukEDR3*, se usó el plásmido de VJT8.87 que contiene *lukE* como plantilla y se amplificó con los cebadores VJT296 y VJT899; VJT902 y VJT297; o VJT900 y VJT901. Para *lukE<sup>DR4</sup>*, se usó el plásmido de VJT8.87 que contiene *lukE* como plantilla y se amplificó con los cebadores VJT296 y VJT903; VJT914 y VJT297; o VJT904 y VJT905. Para *lukE<sup>DR5</sup>*, se usó el plásmido de VJT8.87 que contiene *lukE* y se amplificó con los cebadores VJT296 y VJT911; o VJT906 y VJT297. El plásmido de VJT8.89 que contiene *lukS-PV* se usó y amplificó con los cebadores VJT912 y VJT913 para completar el locus *lukE<sup>DR5</sup>*. Para obtener el producto de PCR final, cada fragmento de ADN se incluyó en una reacción PCR que contenía los cebadores flanqueantes VJT296 y VJT297. Los amplicones se clonaron en pET14b-6xHis (Novagen) usando sitios de restricción XhoI y BamHI, dando como resultado secuencias químicas de *lukE<sup>DR</sup>* etiquetadas con 6 Histidinas (His) en el terminal N.
- 50 Generación de cepas de expresión de *E. coli lukE<sup>DR</sup>*. Los plásmidos pET14b-6xHis-*lukEDR* se transformaron en DH5α

*Escherichia coli* (*E. coli*) y transformantes seleccionados por resistencia a ampicilina (Fisher). Los clones positivos se transformaron en T7 LysY/LacQ de *E. coli* (New England BioLabs) para la purificación de proteínas recombinantes como se describió anteriormente (Alonzo et al., "Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth *in Vivo*", Mol. Microbiol. 83: 423-435 (2012); DuMont et al., "Characterization of a New Cytotoxin That Contributes to *Staphylococcus aureus* Pathogenesis", Mol. Microbiol. 79: 814-825 (2011)). La concentración de proteínas se midió usando el kit de ensayo de proteínas Thermo Scientific Pierce BCA.

Generación de proteínas híbridas/mutadas. Para generar HlgA/D<sup>DR4</sup> (los aminoácidos 182-196 de HlgA se reemplazan con los aminoácidos correspondientes de LukE): se usó ADN genómico de Newman como plantilla y se amplificó con los cebadores VJT635 y VJT1267; y VJT1209 y VJT1266 (véanse las Tablas 1-3 a continuación para obtener información detallada sobre cebadores y cepas). Para generar el locus mutante completo, los productos de ADN resultantes se usaron como plantilla para una reacción PCR de extensión de superposición de costura final usando los cebadores flanqueantes VJT635 y VJT1209. El amplicón final se clonó en el vector pOS1-P<sub>lukAB-lukA<sup>S.S.</sup></sub>-6xHis usando sitios de restricción BamHI y PstI, que dieron como resultado HlgA/E<sup>DR4</sup> etiquetado con 6 Histidinas en el terminal N.

Para generar HlgA/S<sup>DR4</sup> (los aminoácidos 182-196 de HlgA se reemplazan con los aminoácidos correspondientes de LukS-PV): se usó ADN genómico de Newman como plantilla y se amplificó con los cebadores VJT635 y VJT1263; y VJT1209 y VJT1262 (véase las Tablas 1-3 a continuación para obtener información detallada sobre cebadores y cepas). Para generar el locus mutante completo, los productos de ADN resultantes se usaron como plantilla para una reacción PCR de extensión de superposición de costura final usando los cebadores flanqueantes VJT635 y VJT1209. El amplicón final se clonó en el vector pOS1-P<sub>lukAB-lukA<sup>S.S.</sup></sub>-6xHis usando sitios de restricción BamHI y PstI, que dieron como resultado HlgA/S<sup>DR4</sup> etiquetado con 6 Histidinas en el terminal N.

Para generar LukE<sup>P184A,G186A,P187A,G189A</sup>: se usó ADN genómico de Newman como plantilla y se amplificó con los cebadores VJT629 y VJT1179; y VJT1114 y VJT1180 (véanse las Tablas 1-3 a continuación para obtener información detallada sobre cebadores y cepas). Para generar el locus mutante completo, se usaron los productos de ADN resultantes como plantilla para una reacción PCR de extensión de superposición de costura final usando los cebadores flanqueantes VJT629 y VJT1114. El amplicón final se clonó en el vector pOS1-P<sub>lukAB-lukA<sup>S.S.</sup></sub>-6xHis utilizando sitios de restricción BamHI y PstI, que dieron como resultado LukE<sup>P184A,G186A,P187A,G189A</sup> etiquetado con 6 Histidinas en el terminal N.

Producción de proteínas. Todos los plásmidos se transformaron en DH5α de *E. coli* y se seleccionaron por resistencia a ampicilina. Luego, los plásmidos positivos se electroporaron en células competentes RN4220 de *S. aureus* de restricción negativa, seguido por electroporación en células competentes sin toxinas de Newman de *S. aureus* (Newman delta *lukED*, *hlg::tet*, *lukAB::spec*, *hla::ermC*) para la producción de proteínas. La selección de mutantes en *S. aureus* se realizó por resistencia al cloranfenicol.

Tratamientos con leucotoxinas. Las células HEK293T, THP-1, PBMC humanas primarias y las células de exudado peritoneal murino primario se trataron con LukE, LukD o LukED como se describió previamente (Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED", Nature 493: 51-55 (2013)). En todos los experimentos, se sembraron 1-2 x 10<sup>5</sup> células en placas de 96 pozos. Para los experimentos con células humanas o murinas primarias, las intoxicaciones se llevaron a cabo durante 30 minutos en hielo, y las células se tiñeron luego con un colorante de fijable, así como con anticuerpos para marcadores de superficie celular, seguido por análisis de citometría de flujo. Para todos los demás ensayos de citotoxicidad, las células se incubaron en presencia de toxinas durante 1 hora a 37 °C más 5% de CO<sub>2</sub>, luego se incubaron durante 1-2 horas adicionales con un colorante metabólico (Cell Titer, Promega).

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Cepa	Fondo	Descripción	Designación	Referencia
VJT8.16	<i>S. aureus</i> Newman	Newman Δ <i>lukED</i>	Δ <i>lukED</i>	3
VJT31.58	<i>S. aureus</i> Newman	Newman ΔΔΔΔ	Newman ΔΔΔΔ	Este estudio
VJT8.87	<i>Escherichia coli</i> DH5a	pET14b-6xHis- <i>lukE</i>	<i>lukE</i>	3
VJT8.89	<i>Escherichia coli</i> DH5a	pET14b-6xHis- <i>lukS-PV</i>	<i>lukD</i>	4
VJT20.78	<i>Escherichia coli</i> T7 LysY/LacQ	pET14b-6xHis- <i>lukE</i>	LukE	3
VJT21.44	<i>Escherichia coli</i>	pET14b-6xHis- <i>lukD</i>	LukD	3

ES 2 811 527 T3

Cepa	Fondo	Descripción	Designación	Referencia
	T7 LysY/LacQ			
VJT22.39	<i>Escherichia coli</i> T7 LysY/LacQ	pET14b-6xHis- <i>lukS-PV</i>	LukS-PV	4
VJT22.41	<i>Escherichia coli</i> T7 LysY/LacQ	pET14b-6xHis- <i>lukF-PV</i>	LukF-PV	4
VJT34.08	<i>Escherichia coli</i> DH5a	pET14b-6xHis- <i>lukE<sup>DR1</sup></i>	<i>lukE<sup>DR1</sup></i>	Este estudio
VJT34.09	<i>Escherichia coli</i> DH5a	pET14b-6xHis- <i>lukE<sup>DR2</sup></i>	<i>lukE<sup>DR2</sup></i>	Este estudio
VJT34.36	<i>Escherichia coli</i> DH5a	pET14b-6xHis- <i>lukE<sup>DR3</sup></i>	<i>lukE<sup>DR3</sup></i>	Este estudio
VJT34.58	<i>Escherichia coli</i> DH5a	pET14b-6xHis- <i>lukE<sup>DR4</sup></i>	<i>lukE<sup>DR4</sup></i>	Este estudio
VJT34.59	<i>Escherichia coli</i> DH5a	pET14b-6xHis- <i>lukE<sup>DR5</sup></i>	<i>lukE<sup>DR5</sup></i>	Este estudio
VJT34.13	<i>Escherichia coli</i> T7 LysY/LacQ	pET14b-6xHis- <i>lukE<sup>DR1</sup></i>	LukE <sup>DR1</sup>	Este estudio
VJT34.15	<i>Escherichia coli</i> T7 LysY/LacQ	pET14b-6xH- <i>lukE<sup>DR2</sup></i>	LukE <sup>DR2</sup>	Este estudio
VJT34.49	<i>Escherichia coli</i> T7 LysY/LacQ	pET14b-6xHis- <i>lukE<sup>DR3</sup></i>	LukE <sup>DR3</sup>	Este estudio
VJT34.60	<i>Escherichia coli</i> T7 LysY/LacQ	pET14b-6xHis- <i>lukE<sup>DR4</sup></i>	LukE <sup>DR4</sup>	Este estudio
VJT34.62	<i>Escherichia coli</i> T7 LysY/LacQ	pET14b-6xHis- <i>lukE<sup>DR5</sup></i>	LukE <sup>DR5</sup>	Este estudio
VJT31.59	<i>S. aureus</i> Newman	Newman $\Delta\Delta\Delta\Delta$ -poS1- <i>p<sub>lukA</sub>-lukA<sup>s.s.</sup>-6xHis-</i>	Vacío	19; este estudio
VJT31.62	<i>S. aureus</i> Newman	Newman $\Delta\Delta\Delta\Delta$ + pOS1- <i>p<sub>lukA</sub>-lukA<sup>s.s.</sup>-6xHis-lukED</i>	<i>lukED</i>	Este estudio
VJT36.01	<i>S. aureus</i> Newman	Newman $\Delta\Delta\Delta\Delta$ -pOS1- <i>p<sub>lukA</sub>-lukA<sup>s.s.</sup>-6xHis-lukE<sup>DR4D</sup></i>	<i>lukE<sup>DR4D</sup></i>	Este estudio
VJT36.03	<i>S. aureus</i> Newman	Newman $\Delta lukED$ + pJC1112-	$\Delta lukED$	Este estudio
VJT23.61	<i>S. aureus</i> Newman	Newman $\Delta lukED$ + pJC1112- <i>lukED</i>	$\Delta lukED::lukED$ o + <i>lukED</i>	3
VJT35.90	<i>S. aureus</i> Newman	Newman $\Delta lukED$ + pJC1112- <i>lukE<sup>DR4D</sup></i>	$\Delta lukED::lukEDR4D$ o + <i>lukE<sup>DR4D</sup></i>	Este estudio

<sup>3</sup> Alonzo et al., Mol. Microbiol. 83:423-435 (2012); <sup>4</sup>Alonzo et al., Nature 493:51-55 (2013); <sup>19</sup> Dumont et al., PNAS (2013)

Tabla 2. Cebadores utilizados en estos estudios

Cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:
VJT296	5'-CCCC-CTCGAG-AATACTAATAATTGAAAAATATTGGTGATG-3'	17
VJT891	5'-GTAATAAGTAGCTTTTGAAATTAATAAAAACCTTGCATTTTAAC-3'	18
VJT894	5'-CATATAAAAGCAATGAGGTGCCATTCCAAATATAATATAG-3'	19
VJT892	5'-TCAAAGACTACTTATTACAATTAACAAAAACACAGATCATATAAAAGCAATGAGG-3'	20
VJT893	5'-CCTCATTTGCTTTTATATGATCTGTGTTTTTGTAAATGTAAGTAGTCTTTTGA-3'	21
VJT895	5'-GTTTTGTTGATTATAACTAATTTGTTTTAGAATAATTAATG-3'	22
VJT898	5'-GAACGTCAAAAATTCAAAAATCTGTTAAATGGGGTG-3'	23
VJT896	5'-AGTTATAATCAACAAAAACTATATCAGTGAAGTAGAACGTCAAAATTCA-3'	24
VJT897	5'-TGAATTTTGACGTTCTACTTCACTGATATAGTTTTGTTGATTATAACT-3'	25
VJT899	5'-GTGATAAATGAATTAGCTTTAACACCCCATTTAAC-3'	26
VJT902	5'-GTAAAAATGCTGGACATGATCCAAATTTATTTGTTGG-3'	27
VJT900	5'-GCTAATTCATTTATCACATCATTAGGTAAAAATGCTGGACATGAT-3'	28
VJT901	5'-ATCATGTCAGACATTTTACCTAATGATGTGATAAATGAATTAGC-3'	29
VJT903	5'-CTATATGGTTTATATCCAACAATAAATAATCTATCATGCGCAGA-3'	30
VJT914	5'-GACTATTTTGTCCAGACAATCAATGGCCACCTTTAGTTCAAAG-3'	31
VJT904	5'-TGTTGGATATAAACCATATAGTCAAAAATCCGAGAGACTATTTTGTCCAGAC-3'	32
VJT905	5'-GTCTGGAACAAAAATAGTCTCTCGGATTTTGACTATATGGTTTATATCCAACA-3'	33
VJT911	5'-CATGAGTAACATCCATATTTCTACCATATGAAATTTCAAATTC-3'	34
VJT906	5'-GAGACTATTTTGTCCAGATAATCAATGGCCACCTTTAG-3'	35
VJT912	5'-GAAATTTGAAATTTTCATATGGTAGAAAATATGGATGTTACTCATG-3'	36
VJT913	5'-CAAAGTTTCTATTTACAAAATGCATTTGTGATTTCTAGATCCCTTC-3'	37
VJT297	5'-CCCC-GGATCC-TTA-ATTATGTCCCTTTCACTTTAATTTTCG-3'	38
VJT605	5'-CCCC-CTGCAG-GATAGGTGAGATGCATACACAAC-3'	39

(continuación)

Cebador	Secuencia del cebador	SEQ ID NO:
VJT299	5'-CCCC-GGATCC-TTA-TACTCCAGGATTAGTTTCTTTAG-3'	40
VJT1019	5'-CAATATTTTCAATATTAGTATTTGCTCTAGATTCTTGAATCGGAGA-3'	41
VJT1020	5'-TCTCCGATTCGAAGAACTAGAGCAAACTACTAAATTGAAAATATTG-3'	42
VJT1021	5'-ACTAAATTTTTCATTTTCATAATTAATGTCCTTTCACCTT-3'	43
VJT1022	5'-AAGTGAAGGACATAATTAATGAAAAATGAAAAATAGT-3'	44
VJT629	5'-CCC-GGATCC-AA TACTAATATTGAAAA TATTGGTGATG-3'	45
VJT630	5'-CCC-CTGCAG-TTA-TACTCCAGGATTAGTTTCTTTAG-3'	46
VJT629	5'-CCCGGATCC-AA TACTAATATTGAAAA TATTGGTGATG-3'	47
VJT635	5'-CCCGGATCC-GAAAAA TAGAAGATA CGGCC-3'	48
VJT1114	5'-CCCCTGCAGTTA-ATTATGTCTTTCACTTAATTTTCG-3'	49
VJT1179	5'-GCAAAATATTCCTTGTCTGATGCTGTTGCTGCAATTTGCACCTTTGTACGAA TAAATC-3'	50
VJT1180	5'-GATATTTTTCGTACAAAGTGCAAATGCAGCAACAGCATCAGCAAGAGAA TATTTTGC-3'	51
VJT1209	5'-CCCCTGCAGTTACTTAGGTGTGATGCTTTTAA TTTTAC-3'	52
VJT1262	5'-GGATATAAACCATATAGTCAAAATCCGAGAGACTATTTTGTCCAGATAATCAACTACCTCC-3'	53
VJT1263	5'-AACAAAATAGTCTCTCGGATTTTGACTATATGGTTTATATCCTGCAAAATAAGTATTGATCATATGC-3'	54
VJT1266	5'-CAAAGTCCAAATGGTCCAACAGGTTCCAGCAAGAGAA TATTTGCTCCAGATAATCAACTACCTCC-3'	55
VJT1267	5'- AGCAAAATATTCCTTCTTGC TGAACCTGTGGACCATTTGGACTTTGTGCCAAATAAGTATTGATCATATGC- 3'	56

Tabla 3. Plásmidos utilizados en estos estudios.

Nombre del plásmido	Descripción	Referencia
pET14b-6xHis-	Vector de clonación y expresión que contiene una etiqueta 6x-His	Novagen
pOS1-p <sub>lukA</sub> -lukA <sup>s.s.</sup> -6xHis-	Vector pOS1 modificado que contiene el promotor <i>lukA</i> con su secuencia señal endógena que dirige la expresión del gen	19
pOS1-p <sub>lukA</sub> -lukA <sup>s.s.</sup> -6xHis-lukED	Vector pOS1 modificado que contiene el promotor <i>lukA</i> con su secuencia señal endógena que dirige la expresión de <i>lukED</i>	Este estudio
pOS1-p <sub>lukA</sub> -lukA <sup>s.s.</sup> -6xHis-lukE <sup>DR4D</sup>	Vector pOS1 modificado que contiene el promotor <i>lukA</i> con su secuencia señal endógena que dirige la expresión de <i>lukE<sup>DR4D</sup></i>	Este estudio
pJC1112-	Vector de integración cromosómica que da como resultado la integración en el sitio SaPI-1	3
pJC1112-lukED	Vector de integración cromosómica con <i>lukED</i> integrado en el sitio SaPII que da como resultado una sola copia de complementación	3
pJC1112-lukE <sup>DR4D</sup>	Vector de integración cromosómica con <i>lukE<sup>DR4D</sup></i> integrado en el sitio SaPII que da como resultado una sola copia de complementación	Este estudio

<sup>3</sup> Alonzo et al., Mol. Microbiol. 83: 423-435 (2012); <sup>19</sup>Dumont et al., PNAS (2013)

5 Ensayos de unión y competición. Para ensayos de unión, se añadieron concentraciones crecientes de GFP-LukE o GFP-LukD a  $5 \times 10^4$  PMN humanos y se incubaron durante 30 minutos en hielo, luego se lavaron una vez en tampón de FACS y se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente seguido de análisis por citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de las células GFP<sup>+</sup> se midió para establecer la concentración de toxina requerida para lograr la unión saturable. Para los ensayos de competencia restantes, las concentraciones crecientes de LukE o LukS-PV se incubaron conjuntamente con una concentración saturable constante de LukE-GFP (300 nM) durante 30 minutos. Las células se lavaron una vez en tampón de FACS, se fijaron durante 15 minutos en tampón de fijación de FACS, se lavaron nuevamente en tampón de ACS y la unión se evaluó mediante citometría de flujo. La intensidad fluorescente media de GFP se representa como % de GFP<sup>+</sup>, con base en la fluorescencia máxima observada tras la incubación con GFP-LukE 300 nM. Para los ensayos de competición con CXCL8 o CXCL1, se añadió una respuesta a la dosis de cualquiera de las quimiocinas a PMN humanos durante 30 minutos en hielo, seguido de la adición de GFP-LukE 300 nM. Las células se lavaron una vez en tampón de FACS, se fijaron durante 15 minutos en tampón de fijación de FACS, se lavaron nuevamente en tampón de FACS y la unión se evaluó mediante citometría de flujo como se describió anteriormente. Los resultados de estos ensayos se representaron gráficamente utilizando el software GraphPad PRISM (versión 5.0f, GraphPad PRISM Software, Inc.).

20 Generación de cepas de integración cromosómica de *S. aureus*. Para la complementación con LukED de tipo silvestre, se amplificó el locus completo de *lukED* a partir de ADN genómico de *S. aureus* Newman usando los siguientes cebadores: VJT605 y VJT299 y la integración cromosómica se realizó como se describe (Alonzo et al., "Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth *in Vivo*", Mol. Microbiol. 83:423-435 (2012)). Para generar el constructo de integración *lukE<sup>DR4D</sup>*, la se amplificó región promotora de *lukED* a partir de ADN genómico de *S. aureus* Newman usando los cebadores VJT605 y VJT1019. La región de codificación de *lukE<sup>DR4</sup>* se amplificó usando plásmido purificado de la cepa VJT34.58 que contiene *lukE<sup>DR4</sup>* como plantilla y se amplificó con los cebadores VJT1020 y VJT1021. Se usó ADN genómico de *S. aureus* Newman para amplificar *lukD* y la región intergénica entre *lukE* y *lukD* usando los cebadores VJT1022 y VJT299. Se configuró una reacción PCR de solapamiento final con los fragmentos de ADN resultantes y los cebadores VJT605 y VJT299. Los constructos *lukED* y *lukE<sup>DR4D</sup>* se transformaron en DH5α de *E. coli* y los clones se seleccionaron por resistencia a ampicilina. Los plásmidos purificados se clonaron en pJC1112 usando sitios de restricción BamHI y PstI y se transformaron en DH5α. Los plásmidos recombinantes resultantes se introdujeron por electroporación en la cepa RN9011, que contiene el plásmido pRN7023 que codifica la integrasa del fago SaPI-1 para facilitar la integración cromosómica de copia única en el sitio SaPI-1 y se seleccionó por su resistencia al cloranfenicol y la eritromicina, como se describió anteriormente (Alonzo et al., "Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth *in Vivo*", Mol. Microbiol. 83:423-435 (2012)). Los constructos integrados de SaPI-1 se transdujeron luego en la cepa VJT8.16, Newman  $\Delta$ *lukED*, utilizando métodos previamente descritos (Alonzo et al., "Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth *in Vivo*", Mol. Microbiol. 83:423-435 (2012)).

40 Para generar una cepa  $\Delta$ *lukED* que contiene un vector vacío, el vector pJC1112 se sometió a electroporación en

RN9011 como anteriormente. La transducción mediada por bacteriófagos se usó luego para introducir el vector de complementación integrado en la cepa Newman  $\Delta lukED$  de *S. aureus* utilizando métodos descritos previamente (Alonzo et al., "Staphylococcus aureus leucocidina ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth *in Vivo*", Mol. Microbiol. 83:423-435 (2012)).

5 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento. Las cepas de *E. coli* se cultivaron habitualmente en caldo Luria Bertani (LB) suplementado con ampicilina a 30 °C con agitación a 180 RPM. Para purificar proteínas de *E. coli*, las bacterias se subcultivaron 1:100 en LB suplementado con ampicilina y se incubaron a 37 °C con agitación a 220 RPM, luego se indujeron durante la noche con una concentración final de isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido de 0,1 mM a 16 °C y 220 RPM. Las cepas de *S. aureus* se cultivaron habitualmente a 37 °C con agitación de 180 RPM en RPMI más ácidos casamino al 10% o caldo de soja triptico en presencia o ausencia de antibiótico como se indica. Para generar una cepa sin toxinas de *S. aureus* Newman, una cepa parental Newman  $\Delta lukED$  descrita previamente (Alonzo et al., "Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth *in Vivo*", Mol. Microbiol. 83:423-435 (2012)) se transdujo con el fago que codifica *hlgACB::tet*, seguido por *lukAB::spec*, luego *hla::erm*.

20 Generación de cepa sin toxinas de *S. aureus* Newman que contiene *lukED* y *lukE<sup>DR4</sup>D*. El estudio de los efectos de LukED y su derivado LuE<sup>DR4</sup>D *ex vivo* se complicó por la expresión de bajo nivel de la toxina en condiciones de crecimiento *in vitro* (Alonzo et al., "Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth *in Vivo*", Mol. Microbiol. 83: 423-435 (2012)), así como la mayor abundancia *in vitro* de otras leucotoxinas que se dirigen a tipos de células similares utilizados en ensayos *ex vivo*. Para superar estas complicaciones, se implementó un sistema de evaluación de la actividad de leucotoxina aislada mediante el uso de la cepa Newman sin toxinas  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $\Delta lukED$ ,  $\Delta hlg::tet$ ,  $\Delta LukAB::spec$ ,  $\Delta hla::erm$ ) descrita anteriormente, y la expresión basada en plásmidos de LukED y su derivado LuE<sup>DR4</sup>D. Los loci *lukED* y *lukE<sup>DR4</sup>* se amplificaron a partir de las cepas de integración cromosómica pJC1112 descritas anteriormente usando los cebadores VJT629 y VJT630 con sitios de restricción BamHI y PstI. Los amplicones se subclonaron en el vector pOS1 modificado diseñado para expresar leucotoxinas marcadas con 6xHis bajo el control del promotor *lukA* (pOS1-*plukA-lukAs.s.-6xHis*) como se describió previamente (Dumont et al., "The Staphylococcus aureus LukAB Cytotoxin Kills Human Neutrophils by Targeting the CD11b Subunit of the Integrin Mac-1", PNAS (2013)), seguido por la transformación en la cepa de *S. aureus* sin toxinas Newman  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  ( $\Delta lukED$ ,  $\Delta hlg::tet$ ,  $\Delta lukAB::spec$ ,  $\Delta hla::erm$ ).

35 Experimentos de infección *ex vivo*. Las cepas de *S. aureus* que contienen ya sea el constructo del vector pOS1-*plukA-lukAs.s.-6xSu* que no contiene toxina (vacío), *lukED* o *lukE<sup>DR4</sup>D* se subcultivaron durante 4,5 horas, seguido de normalización a  $1 \times 10^9$  UFC por mL en RPMI + FBS al 10%. Las células se diluyeron 1:10 y se añadieron 20  $\mu$ L a 80  $\mu$ L de medio que contenía  $2 \times 10^5$  PMN sembrados en placas de 96 pozos. Las infecciones se llevaron a cabo durante 3,5 horas a 37 °C con agitación a 180 RPM. Se añadieron 2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de lisostafina durante 20 minutos a 37 °C con agitación a 180 RPM para matar todas las bacterias. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1.500 RPM y 4 °C, seguido de fijación en tampón de fijación de FACS (PBS + FBS al 2% + paraformaldehído al 2% + azida sódica al 0,05%). Para analizar la muerte mediada por toxinas por citometría de flujo, se evaluó el agotamiento celular de las células vivas en el cuadrante. El porcentaje de muerte celular se calculó comparando las células restantes en el cuadrante de las vivas con aquella de la cepa Newman  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  que contiene el vector vacío modificado con pOS1-*plukA* vacío (sin toxina), que se fijó como 0% de muertes.

45 Ensayos bioquímicos para examinar las interacciones entre LukED y CXCR1 o CXCR2. Las células HEK293T se transfectaron transitoriamente con ADNc que codifican CXCR1 o CXCR2 marcados con HA en el terminal N (Centro de recursos de ADNc de Missouri S&T) usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se separaron con PBS que contenía EDTA 5 mM y las proteínas de membrana se solubilizaron (aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por condición) durante 1 hora usando tampón de lisis (PBS + imidazol 10 mM (Fisher) + Brij O10 al 1% (Sigma) + PMSF 1 mM (Thermo Scientific) + gránulos de inhibidor de proteasa 2x (Roche)). LukE y LukD etiquetados con His se incubaron con resina Ni-NTA equilibrada (Qiagen) durante 2 horas, seguido de tres lavados en tampón de lisis. Los lisados y la resina se incubaron juntos durante 2 horas, seguidos de tres lavados en tampón de lisis y resuspensión final de la resina en 45  $\mu$ L de tampón de muestra de SDS 4x. Las muestras de proteínas se corrieron en geles de SDS-PAGE al 10% a 80 V, seguido de transferencia a membranas de nitrocelulosa (GE) durante 1 hora a 1 Amp. Las membranas se bloquearon con PBS + Tween-20 al 0,01% + leche descremada al 5% durante 1 hora y se incubaron durante la noche a 4 °C con cualquier anticuerpo anti-His diluido 1:3.000 en PBS + Tween-20 al 0,01% para toxinas (Cell Sciences) o anticuerpo anti-HA diluido 1:1.000 con PBS+ Tween-20 0,01% + leche descremada al 5% para los receptores (Covance). Al día siguiente, se añadió el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con HRP (Bio-Rad) a las membranas durante 1 hora en PBS + Tween-20 al 0,01% + leche descremada al 5%, seguido de incubación con el sustrato de máxima sensibilidad Super Signal West Femto (Thermo Scientific) para detección en películas de autorradiografía (LabScientific, Inc).

65 Mediciones de movilización de calcio. La activación de CXCR1 y CXCR2 en PMN humanos se evaluó utilizando el indicador fluorescente de calcio Fluo4-AM (Invitrogen) como se describió previamente (Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for Staphylococcus aureus Leukotoxin ED", Nature 493: 51-55 (2013)). Brevemente, las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con 3  $\mu$ M de Fluo4-AM en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) seguido de tres lavados en HBSS y equilibrio a 37 °C durante 30 minutos. Los niveles basales de calcio se analizaron

con el tiempo en un citómetro de flujo durante 60 segundos. En este punto, se añadieron CXCL8, CXCL1 o LukE (300 nM) a las células y se evaluó la intensidad de fluorescencia media a lo largo del tiempo durante 4 minutos adicionales. La intensidad fluorescente media a lo largo de intervalos de 5 segundos se graficó para visualización gráfica.

5 Experimentos murinos *in vitro* e *in vivo*. Para evaluar la muerte de células murinas mediada por LukED *in vitro*, se inyectaron intraperitonealmente ratones C57BL/6 de tipo silvestre (Taconic) con  $1 \times 10^7$  UFC de *S. aureus* Newman  $\Delta lukED$  destruidas por calor. Veinticuatro horas después de la inyección, se inyectó otra dosis de  $1 \times 10^7$  UFC de *S. aureus* Newman  $\Delta lukED$  destruidas por calor como antes. Después de veinticuatro horas adicionales, se sacrificaron los ratones y se recogieron las células inmunes mediante lavado de la cavidad peritoneal usando 8 mL de PBS. Los  
10 glóbulos rojos se lisaron usando 2 mL de tampón de lisis ACK (Gibco) seguido de resuspensión de las células de exudado peritoneal restantes en RPMI + FBS al 10%. Las células se incubaron con PBS, LukED o LukE<sup>DR4D</sup> (300 nM) y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS y luego se tiñeron con el colorante de viabilidad fijable eFluor-450, seguido de tinción de la superficie celular con anticuerpos CD11b, B220, F480, CD3, Ly6G, CCR5 y CXCR2. La viabilidad celular de poblaciones de células inmunes  
15 específicas se analizó posteriormente en un citómetro de flujo LSRII (BD). Los gráficos de FACS son representativos de los resultados obtenidos de células aisladas de al menos 3 animales independientes. La muerte celular se cuantificó y se mostró gráficamente como el porcentaje de células eFluor-450+.

Para experimentos *in vivo*, se anestesiaron ratones hembra C57BL/6 de 8 semanas (Taconic) con 250  $\mu$ L de Avertina (2,2,2-tribromoetanol disuelto en alcohol terc-amílico y diluido a una concentración final de 2,5 % v/v en solución salina estéril), seguido de la inyección retroorbital de  $1 \times 10^7$  UFC de Newman  $\Delta lukED$ ,  $\Delta lukED::lukED$  y  $\Delta lukED::lukE^{DR4D}$  isogénico. Noventa y seis horas después de la infección, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los órganos y se  
20 homogeneizaron para evaluar la carga bacteriana (unidades formadoras de colonias, UFC). Para determinar los efectos de la infección con estas cepas en las células inmunes, las suspensiones de células inmunes de órganos se purificaron usando una centrifugación en gradiente de densidad 40/80 Percoll (GE Healthcare) y posteriormente se procesaron y tiñeron como se describió anteriormente (Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED" Nature 493: 51-55 (2013)). La viabilidad celular de poblaciones específicas de células inmunes se determinó mediante análisis de citometría de flujo en un citómetro de flujo LSRII (BD). Las gráficas de FACS son  
25 representativas de los resultados obtenidos de al menos 9 animales infectados por grupo. La muerte celular se cuantificó y se mostró gráficamente como el porcentaje de células eFluor450+.

Para los experimentos de supervivencia, los subcultivos de 3 horas de cepas isogénicas Newman  $\Delta lukED$ ,  $\Delta lukED::lukED$  y  $\Delta lukED::lukE^{DR4D}$  se normalizaron a  $5 \times 10^8$  UFC por mililitro usando PBS. Se anestesiaron  
35 intraperitonealmente ratones ND4 hembra (Harlan) de cinco a seis semanas de edad con 250  $\mu$ L de Avertina, seguido de una inyección retroorbital de 100  $\mu$ L de bacterias normalizadas, para un recuento final de UFC de  $5 \times 10^7$  UFC. La supervivencia de los ratones se controló con el tiempo hasta que se alcanzaron signos de morbilidad, como postura encorvada, pelaje erizado, pérdida de peso, incapacidad para ingerir alimentos o agua, ataxia y parálisis de las extremidades posteriores, momento en el que los ratones se sacrificaron inmediatamente y se trazaron curvas de supervivencia contra tiempo horas).

40 Perfiles de exoproteína y análisis de inmunotransferencia de la secreción de proteína de *S. aureus*. Cepas de *S. aureus* Newman  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  + pOS1-*plukA-lukAs.s.-6xHis-lukED*, Newman  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  + pOS1-*plukA-lukAs.s.-6xHis-lukE^{DR4D}*, Newman  $\Delta lukED$  + pJC1112-, Newman  $\Delta lukED$  + pJC1112-*lukED*, Newman  $\Delta lukED$  + pJC1112-*lukEDR4D* y Newman  $\Delta lukED\Delta hlgACB$  se cultivaron hasta la fase logarítmica tardía a 37 °C con agitación 180 RPM durante 5 horas. Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 4.000 RPM durante 15 minutos seguido de la eliminación de 1,3 mL de sobrenadante bacteriano y la adición de ácido tricloroacético (concentración final del 10%). Las proteínas se dejaron precipitar durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las proteínas precipitadas se sedimentaron por centrifugación a 15.000 RPM durante 30 minutos, se lavaron con etanol al 100% y se resuspendieron en 60  $\mu$ L de tampón de muestra  
45 1x. Las muestras se sometieron a agitación tipo vórtice y se calentaron a ebullición durante 5 minutos antes de SDS-PAGE. Para inmunotransferencias anti-His, anti-LukE y anti-LukD, las exoproteínas de *S. aureus* se resolvieron en geles de SDS-PAGE al 10% seguido de transferencia a nitrocelulosa a 1 Amp durante 1 hora. Las membranas se bloquearon durante 1 hora en PBS + Tween-20 al 0,01% + leche descremada al 5%; se sondearon con anticuerpos primarios en las siguientes diluciones: anti-His (1:3.000), anti-LukE (1:5.000) y anti-LukD (1:5.000); se lavaron tres veces con PBST; se sondearon con anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón (para anticuerpo anti-His) o anti-conejo (para anticuerpos anti-LukE y anti-LukD) conjugados con Alexafluor-680 durante 1 hora; seguido de obtención de imágenes en una cámara Odyssey (LI-COR). Para las cepas que sobreexpresan LukED o LukE<sup>DR4D</sup> (Newman  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  + pOS1-*plukA-lukAs.s.-6xHis-lukED*, Newman  $\Delta\Delta\Delta\Delta$  + pOS1-*plukA-lukAs.s.-6xHis-lukE^{DR4D}*) se muestra un gel  
50 teñido con Coomassie para demostrar la disminución de la afinidad por el anticuerpo LukE hacia el mutante LukE<sup>DR4D</sup>. Para las cepas que producen niveles endógenos de LukED y LukE<sup>DR4D</sup> (se incluyó Newman  $\Delta lukED$  + pJC1112-, Newman  $\Delta lukED$  + pJC1112-*lukED*, Newman  $\Delta lukED$  + pJC1112-*lukE^{DR4D}*) se incluyó un mutante doble  $\Delta lukED\Delta hlgACB$  debido a la reactividad cruzada del anticuerpo anti-LukE con HlgC3. Todas las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. Los anticuerpos  $\alpha$ -LukE y  $\alpha$ -LukD se generaron como se describió previamente.

65 Modelado estructural de la diversidad estructural de LukE/LukS-PV. Las secuencias de aminoácidos de LukE y LukS-PV se alinearon con ClustalW y se puntuaron con una matriz Risler de acuerdo con el grado de variación de secuencia

usando ESPript. Las puntuaciones se mostraron en la superficie de la estructura de LukE con una rampa de color (rojo, naranja, amarillo, verde, azul claro, azul oscuro) en la que los residuos estrictamente conservados son de color rojo, y los residuos más divergentes son de color azul oscuro. Las sustituciones conservadoras están representadas por colores intermedios. Todas las figuras estructurales fueron preparadas usando PyMOL.

5

Ejemplo 1: LukED ataca a CXCR1 y CXCR2 para matar monocitos y PMN

*S. aureus* es una bacteria Gram positiva que es responsable de una morbilidad y mortalidad significativas en todo el mundo (DeLeo & Chambers, "Reemergence of Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Genomics Era", *J. Clin. Invest.* 119: 2464-2474 (2009)). La patogénesis de este organismo depende de la producción de un arsenal de factores de virulencia que se cree que contribuyen a la evasión inmune y la posterior manifestación de la enfermedad (Vandenesch et al., "*Staphylococcus aureus* Hemolysins, Bi-Component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors?", *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2: 12 (2012); Nizet, V "Understanding How Leading Bacterial Pathogens Subvert Innate Immunity to Reveal Novel Therapeutic Targets", *J. Allergy Clin. Immunol.* 120: 13-22 (2007)). Las cepas asociadas con la infección humana pueden producir hasta cinco leucotoxinas bicomponentes diferentes (LukSF-PV/PVL, HlgAB, HlgCB, LukED y LukAB/HG) (Alonzo & Torres, "Bacterial Survival Amidst Immune Onslaught: The Contribution of the *Staphylococcus aureus* Leukotoxins", *PLoS Pathog* 9: e1003143 (2013); Alonzo et al., "*Staphylococcus aureus* Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth in Vivo", *Mol. Microbiol.* 83: 423-435 (2012); Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED", *Nature* 493: 51-55 (2013); Vandenesch et al., "*Staphylococcus aureus* Hemolysins, Bi-Component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors?" *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:12 (2012); Pantón & Valentine, "Staphylococcal Toxin", *The Lancet* 506-508 (1932); Löffler et al., "*Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine Leucocidin is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils", *PLoS Pathog.* 6: e1000715 (2010); Labandeira-Rey et al., "*Staphylococcus aureus* Pantón-Valentine Leucocidin Causes Necrotizing Pneumonia", *Science* 315: 1130-1133 (2007); Yamashita et al., "Crystal Structure of the Octameric Pore of Staphylococcal Gamma-Hemolysin Reveals the Beta-Barrel Pore Formation Mechanism by Two Components", *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 17314-17319 (2011); Dalla Serra et al., "*Staphylococcus aureus* Bicomponent Gamma-Hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, Can Form Mixed Pores Containing All Components", *J. Chem. Inf. Model.* 45: 1539-1545 (2005); Morinaga et al., "Purification, Cloning and Characterization of Variant LukE-LukD With Strong Leukocidal Activity of Staphylococcal Bi-Component Leukotoxin Family", *Microbiol. Immunol.* 47: 81-90 (2003); Gravet et al., "Characterization of a Novel Structural Member, LukE-LukD, of the Bi-Component Staphylococcal Leukotoxins Family", *FEBS Lett.* 436: 202-208 (1998); DuMont et al., "Characterization of a New Cytotoxin That Contributes to *Staphylococcus aureus* Pathogenesis", *Mol. Microbiol.* 79: 814-825 (2011); Dumont et al., "*Staphylococcus aureus* Elaborates Leucocidin AB to Mediate Escape From Within Human Neutrophils", *Infect. Immun.* 81: 1830-1841 (2013); Ventura et al., "Identification of a Novel *Staphylococcus aureus* Two-Component Leukotoxin Using Cell Surface Proteomics", *PLoS One* 5: e11634 (2010)). Estas toxinas atacan y matan potentemente a los neutrófilos humanos (células polimorfonucleares; PMN), células inmunes innatas críticas para la defensa contra infecciones bacterianas (Löffler et al., "Staphylococcus aureus Pantón-Valentine Leucocidin is a Very Potent Cytotoxic Factor for Human Neutrophils", *PLoS Pathog.* 6: e1000715 (2010)). Durante muchos años se pensó que estas toxinas eran redundantes, sin embargo, la reciente identificación de factores celulares que facilitan su tropismo celular único ha demostrado lo contrario (Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED", *Nature* 493:51-55 (2013); Spaan et al., "The Staphylococcal Toxin Pantón-Valentine Leucocidin Targets Human C5a Receptors", *Cell Host & Microbe* 13:584-594 (2013); Dumont et al., "The *Staphylococcus aureus* LukAB Cytotoxin Kills Human Neutrophils by Targeting the CD11b Subunit of the Integrin Mac-1", *PNAS* (2013)). Mientras se investigaban los efectos de LukED en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) primarias, se observó que los monocitos dentro de las PBMC aislados de un individuo  $\Delta 32Ccr5$ , que naturalmente carece de CCR5 en la superficie celular (Oswald-Richter et al., "Identification of a CCR5-Expressing T Cell Subset That is Resistant to R5-Tropic HIV Infection", *PLoS Pathog.* 3: e58 (2007)) están dirigido de una manera independiente de CCR5 mediada por LukED (Figura 1A). De manera similar, los monocitos de PBMC aislados de individuos *Ccr5*<sup>+/+</sup> fueron susceptibles a LukED incluso en presencia de Maraviroc, un antagonista de CCR5 que se sabe que bloquea la muerte mediada por LukED de las células CCR5<sup>+</sup> (Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED", *Nature* 493:51-55 (2013)) (Figura 2). Además, los PMN de los donantes de *Ccr5*<sup>+/+</sup> y  $\Delta 32Ccr5$  fueron igualmente susceptibles a LukED (Figura 1B), lo que indica que LukED se dirige a monocitos humanos y PMN de una manera independiente de CCR5.

55

Para evaluar la contribución independiente de CCR5 de LukED en la virulencia de *S. aureus in vivo*, los ratones *Ccr5*<sup>+/+</sup> y *Ccr5*<sup>-/-</sup> se infectaron sistémicamente con cepas isogénicas de *S. aureus* de tipo silvestre (TS) y  $\Delta lukED$  y la carga bacteriana en los hígados infectados se evaluó 96 horas después de la infección. Los ratones *Ccr5*<sup>+/+</sup> infectados con  $\Delta lukED$  mostraron una reducción de 2 log en UFC en comparación con aquellos infectados con TS o la cepa de complementación ( $\Delta lukED::lukED$ ) (Figura 1C). De acuerdo con estudios previos, la carga bacteriana en ratones *Ccr5*<sup>-/-</sup> infectados con *S. aureus* TS se redujo 1 log en comparación con los ratones *Ccr5*<sup>+/+</sup> infectados con *S. aureus* TS (Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED", *Nature* 493: 51-55 (2013)). Por el contrario, los ratones *Ccr5*<sup>-/-</sup> infectados con la cepa  $\Delta lukED$  mostraron una reducción de 3 log en la carga bacteriana en comparación con los ratones *Ccr5*<sup>+/+</sup> infectados con *S. aureus* TS, lo que indica una fuerte contribución de LukED independiente de *Ccr5* a la patogénesis de *S. aureus* (Figura 1C). En conjunto, estos datos indicaron la existencia de un receptor celular LukED alternativo en la superficie de los PMN y monocitos, cuyo objetivo contribuye al

65

establecimiento de la infección sistémica por *S. aureus*.

Para identificar estos objetivos, los receptores de quimiocinas presentes en la superficie de los fagocitos se expresaron ectópicamente en las células 293T del riñón embrionario humano (HEK293T) seguido de la adición de LukED. Usando este enfoque, se determinó que los receptores de quimiocinas CXCR1, CXCR2 y DARC eran suficientes para hacer que las células HEK293T fueran susceptibles a LukED, pero no a la leucotoxina homóloga LukSF-PV (Figura 1D, Figura 3 y Figura 5A), que no ataca CXCR2 (Spaan et al., "The Staphylococcal Toxin Panton-Valentine Leukocidin Targets Human C5a Receptors", *Cell Host & Microbe* 13: 584-594 (2013)).

CXCR1 y CXCR2 también se conocen como las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de interleucina 8, respectivamente (Stillie et al., "The Functional Significance Behind Expressing Two IL-8 Receptor Types on PMN", *J. Leukoc. Biol.* 86: 529-43 (2009)). Estos receptores de quimiocinas interactúan para formar complejos heterodiméricos y homodiméricos en la superficie de los PMN para facilitar la unión de alta afinidad de CXCL8, también conocida como IL8, que promueve el reclutamiento de células inmunes al sitio de infección (Stillie et al., "The Functional Significance Behind Expressing Two IL-8 Receptor Types on PMN", *J. Leukoc. Biol.* 86: 529-43 (2009)). CXCR1 y CXCR2 son proteínas homólogas que exhiben una identidad de aminoácidos del 77%, y se expresan en el linaje mieloide, principalmente en PMN y monocitos (Stillie et al., "The Functional Significance Behind Expressing Two IL-8 Receptor Types on PMN", *J. Leukoc. Biol.* 86: 529-43 (2009)) así como en células asesinas naturales, subconjuntos de células T CD8+ y células epiteliales y endoteliales. Por el contrario, el receptor de antígeno Duffy para quimiocinas (DARC), también conocido como glucoproteína Fy (FY) o CD234, se encuentra principalmente en la superficie de los glóbulos rojos (RBC) y las células endoteliales. DARC es un "sumidero" de quimiocinas CC y CXC, que se cree que elimina el exceso de quimiocinas del torrente sanguíneo. DARC es también el receptor de los parásitos de la malaria humana *Plasmodium vivax* y *Plasmodium knowlesi*. Colectivamente, el descubrimiento de que LukED se une a CXCR1/CXCR2 y DARC proporciona una explicación de cómo LukED ataca a los PMN y RBC, respectivamente.

De acuerdo con su susceptibilidad a LukED, la mayoría de los PMN y monocitos de sangre periférica fueron positivos tanto para CXCR1 como para CXCR2 (Figuras IE e IF). Además, la desactivación con base lentiviral de CXCR2 con ARNph de *Cxcr2* en la línea celular monocítica humana THP-1, que muestra solo CXCR2 (Liu-Bryan et al., "The CXCR1 Tail Mediates Beta1 Integrin-Dependent Cell Migration Via MAP Kinase Signaling", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332: 117-125 (2005)) (Figuras 5B-5C), hicieron que las células fueran resistentes a la muerte por LukED en comparación con los controles de ARNph no objetivo (Figura 1G). Estos datos demuestran que CXCR1 o CXCR2 son necesarios y suficientes para la destrucción de células huésped mediada por LukED.

Ejemplo 2: CXCR1, CXCR2 y DARC también hacen que las células sean susceptibles a HlgA

Una característica común de las leucotoxinas de *S. aureus* es que todas pueden atacar y matar PMN (Vandenesch et al., "Staphylococcus aureus Hemolysins, Bi-Component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors?" *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2: 12 (2012) y Alonzo & Torres", "Bacterial Survival Amidst an Immune Onslaught: The Contribution of the *Staphylococcus aureus* Leukotoxins. *PLoS Pathog.* 9: e1003143 (2013)). Los hallazgos descritos en este documento indican que LukED mata a los PMN atacando a CXCR1/CXCR2. Dado que LukED exhibe una identidad de aminoácidos significativa con LukSF-PV, HlgAB y HlgCB (más del 70%), también se evaluó si estos receptores también hacen que las células huésped sean susceptibles a estas leucotoxinas. CXCR1, CXCR2 y DARC, pero no CCR5, hicieron que las células fueran susceptibles a HlgAB pero no a HlgCB o LukSF-PV (Figuras 4A-4B). La observación de que HlgAB pero no HlgCB se dirige a estos receptores indica que HlgA es la subunidad responsable del tropismo de esta toxina. El hallazgo de que DARC es compatible con la citotoxicidad de HlgAB también está en línea con la observación de que esta toxina exhibe actividad hemolítica.

Ejemplo 3: LukED ataca a los PMN a través de la unión de LukE a CXCR1 y CXCR2

Debido a su papel principal en la defensa contra *S. aureus* (Rigby y DeLeo, "Neutrophils in Innate Host Defense Against *Staphylococcus aureus* Infections", *Semin. Immunopathol.* 34: 237-259 (2012)), el resto de los estudios descritos en el presente documento se centran en el ataque mediado por LukED de CXCR1/CXCR2 en PMN primarios. Se empleó un ensayo de unión en el que los PMN se incubaron con LukE o LukD fusionadas con proteína fluorescente verde (GFP-LukE o GFP-LukD) (Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED", *Nature* 493: 51-55 (2013)). Solo GFP-LukE se unió a PMN de una manera dependiente de la dosis y saturable, mientras que GFP-LukD mostró una asociación de superficie no saturable (Figuras 6A). La unión de GFP-LukE compitió con LukE pero no con la subunidad equivalente de PVL, LukS-PV (Figura 6B), lo que sugiere una interacción específica con CXCR1/CXCR2.

CXCR1/CXCR2 responden principalmente al ligando de quimiocina CXCL8, que es producido por el huésped en respuesta a una lesión e infección (Nasser et al., "Differential Activation and Regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 Monomer and Dimer", *J. Immunol.* 183: 3425-3432 (2009); Stillie et al., "The Functional Significance Behind Expressing Two IL-8 Receptor Types on PMN", *J. Leukoc. Biol.* 86: 529-543 (2009)). Además de CXCL8, CXCR2 también responde a la quimiocina CXCL1 (Nasser et al., "Differential Activation and Regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 Monomer and Dimer", *J. Immunol.* 183: 3425-3432 (2009); Allen et al., "Chemokine: Receptor Structure,

Interactions, and Antagonism", *Annu. Rev. Immunol.* 25: 787-820 (2007)). Para probar si estas quimiocinas pueden inhibir la citotoxicidad mediada por LukED, los PMN se trataron con LukED en presencia de CXCL8 o CXCL1. CXCL8 evitó la muerte de PMN mediada por LukED pero no CXCL1 (Figura 6C), lo que indica que se requiere el bloqueo de ambos receptores para proteger a los PMN de la muerte mediada por LukED. CXCL8 protegió a los PMN de LukED al evitar que LukE se uniera a la superficie celular, un requisito previo para la citotoxicidad (Figura 6D). Si bien LukE y CXCL8 atacan a CXCR1/CXCR2, no parecen comprometer a los receptores con la misma capacidad, ya que LukE no puede provocar la movilización de calcio tras la incubación con PMN (Figura 7). De acuerdo con los estudios de unión de LukEDPMN, los experimentos desplegables revelaron que LukE, pero no LukD, forma complejos con CXCR1 y CXCR2 (Figura 6E).

Ejemplo 4: los residuos de aminoácidos de LukE 182-196 en la región 4 de divergencia son necesarios para el ataque con LukED de las células CXCR1 y CXCR2<sup>+</sup>

LukE y la leucotoxina altamente homóloga LukS-PV comparten una identidad de aminoácidos del 71%, sin embargo, LukS-PV no utiliza receptores de CXCR1/CXCR2 para atacar y matar PMN (Spaan et al., "The Staphylococcal Toxin Panton-Valentine Leukocidin Targets Human C5a Receptors", *Cell Host & Microbe* 13: 584-594 (2013)) (Figura 1D). La alineación de la secuencia de aminoácidos de LukE y LukS-PV reveló cinco regiones que contienen divergencia de secuencia significativa (regiones de divergencia 1-5; DR1-5) (Figura 8). Estos DR están ubicados principalmente en el dominio de RIM de las estructuras de LukE y LukS-PV (Figura 9A-9B), que se ha formulado la hipótesis que desempeña un papel en el reconocimiento del receptor (Menestrina et al., "Ion Channels and Bacterial Infection: The Case of Beta-Barrel Pore-Forming Protein Toxins of *Staphylococcus aureus*", *FEBS Lett.* 552: 54-60 (2003)). Las toxinas híbridas LukE/S-PV se generaron para probar si alguno de estos cinco DR está involucrado en conferir especificidad de LukE a los PMN humanos. Las proteínas híbridas LukE/S-PV se purificaron, se mezclaron en una proporción equimolar con LukD y se incubaron con PMN para evaluar su actividad citotóxica. Solo las toxinas LukE<sup>DR4D</sup> y LukE<sup>DR5D</sup> se atenuaron en su citotoxicidad hacia los PMN en comparación con LukED de tipo silvestre (Figura 9C).

Para evaluar si la falta de citotoxicidad exhibida por los híbridos LukE<sup>DR4</sup> y LukE<sup>DR5</sup> era específica hacia las células que expresan CXCR1/CXCR2, también se probó su actividad hacia las células CCR5<sup>+</sup>. LukE<sup>DR5D</sup> también se vio afectado en la destrucción de células CCR5<sup>+</sup>, lo que sugiere que se requiere DR5 para la actividad de la toxina en lugar de dirigirse al receptor (Figura 9C, 9D). Sorprendentemente, LukE<sup>DR4D</sup> fue capaz de atacar las células CCR5<sup>+</sup> con una potencia similar a aquella de LukED de tipo silvestre, lo que indica que solo DR4 está involucrado en el reconocimiento de CXCR1 y CXCR2 (Figura 9D). Un análisis posterior de las PBMC reveló que LukED también es citotóxico para la mayoría de las células NK y un subconjunto de células T CD8<sup>+</sup>, exclusivamente a través de la expresión de CXCR1 (Figura 10). Además, del mutante LukE<sup>DR4D</sup> se redujo en su potencia para matar monocitos a pesar de su expresión de CCR5 (Figura 10), lo que sugiere que CXCR1/CXCR2 pueden ser los receptores preferidos para el ataque mediado por LukED de estas células de linaje mielóide.

En contraste con LukE de tipo silvestre, LukE<sup>DR4</sup> no pudo competir con GFP-LukE para unirse a la membrana plasmática de PMN, validando el requisito de este dominio para el reconocimiento de células CXCR1/CXCR2<sup>+</sup> (Figura 9E). La secuencia de 15 aminoácidos de LukE<sup>DR4</sup> (residuos 182-196) forma un bucle que contiene dos residuos de glicina (G186 y G189) y dos residuos de prolina (P184 y P187) que presentan una superficie polar distinta de la de LukSPV, que podría determinar el tropismo de LukE hacia CXCR1/CXCR2.

También se investigó la contribución del ataque de CXCR1 y CXCR2 por LukED a la muerte de PMN mediada por *S. aureus* durante la infección *ex vivo*. Dado que *S. aureus* produce una serie de toxinas capaces de matar PMN, se modificó una cepa de *S. aureus* que carece de todas las toxinas principales, en la que se expresó *lukED* o *lukE<sup>DR4D</sup>* en forma trans de un plásmido (Figura 11A). Como se esperaba, la cepa de *S. aureus* sin toxinas no pudo matar los PMN, mientras que la cepa sin toxinas complementada en forma trans con *lukED* pudo matar estas células (Figura 9G). La actividad citotóxica de la cepa de *S. aureus* productora de LukED fue inhibida por CXCL8 y la cepa productora de LukE<sup>DR4D</sup> mostró una muerte significativamente reducida de PMN en comparación con la cepa productora de LukED de tipo silvestre (Figura 9G). Es importante destacar que el defecto en la muerte celular exhibido por la cepa productora de LukE<sup>DR4D</sup> era específico hacia las células CXCR1/CXCR2<sup>+</sup>, ya que las células CCR5<sup>+</sup> eran igualmente susceptibles a las cepas productoras de LukED y LukE<sup>DR4D</sup> (Figura 9H).

Ejemplo 5: La muerte mediada por LukED de células CXCR1 y CXCR2<sup>+</sup> contribuye a la patogénesis de *S. aureus* en modelos de ratón de infección sistémica

Para evaluar si LukED también mata los leucocitos murinos de una manera dependiente de CXCR1/CXCR2, las células de exudado peritoneal murino (PEC) se trataron con LukED o LukE<sup>DR4D</sup>. Mientras que LukED mató ~79% de los PMN, LukE<sup>DR4D</sup> se vio significativamente afectado y solo mató ~8% de estas células. A diferencia de los efectos sobre los PMN, los macrófagos CCR5<sup>+</sup> de la población de PEC eran igualmente susceptibles a LukED y LukE<sup>DR4D</sup> (Figuras 12A y 13A), lo que concuerda con el hallazgo de que LukED mata estas células en una forma estrictamente dependiente de CCR5 (Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for *Staphylococcus aureus* Leukotoxin ED", *Nature* 493: 51-55 (2013)). Además, se evaluó la viabilidad de PMN de tejidos infectados con cepas isogénicas de *S. aureus*  $\Delta$ *lukED*,  $\Delta$ *lukED::lukED* o  $\Delta$ *lukED::lukE<sup>DR4D</sup>* (Figura 11B). Los PMN de ratones infectados con *S. aureus*  $\Delta$ *lukED::lukE<sup>DR4D</sup>* estaban protegidos en gran medida, de forma similar a los ratones infectados con  $\Delta$ *lukED*, de la muerte mediada por

toxinas en comparación con los ratones infectados con  $\Delta lukED::lukED$ . En particular, los PMN de ratones infectados con  $\Delta lukED::lukE^{DR4D}$  eran tan saludables como los PMN de ratones infectados con  $\Delta lukED$  (Figuras 12B y 13B), lo que sugiere que la interacción del dominio DR4 con CXCR1/CXCR2 es necesaria para el ataque de PMN *in vivo*.

5 LukED contribuye a la mortalidad observada en ratones que padecen infección del torrente sanguíneo por *S. aureus* (Alonzo et al., "Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth in Vivo", Mol. Microbiol. 83: 423-435 (2012); Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for Staphylococcus aureus Leukotoxin ED", Nature 493: 51-55 (2013)). Para evaluar el papel del ataque mediado por LukED de CXCR1/CXCR2 para conferir este fenotipo, se monitoreó la supervivencia de animales infectados  
10 sistémicamente con cepas isogénicas de *S. aureus*  $\Delta lukED$ ,  $\Delta lukED::lukED$  o  $\Delta lukED::lukE^{DR4D}$  (Figura 11B). Como era de esperar, los ratones infectados con la cepa  $\Delta lukED$  sobrevivieron a la infección, mientras que los ratones infectados con la cepa complementada con  $\Delta lukED::lukED$  sucumbieron (Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for Staphylococcus aureus Leukotoxin ED", Nature 493: 51-55 (2013)) a la infección. Por el contrario, los ratones infectados con  $\Delta lukED::lukE^{DR4D}$  estaban marcadamente protegidos en comparación con la cepa complementada con  $\Delta lukED::lukED$  (Figura 12C). Estos hallazgos sugieren que el ataque mediado por LukED de CXCR1 o CXCR2  
15 promueve la patogénesis de *S. aureus* *in vivo*.

La identificación de CXCR1 y CXCR2 como receptores celulares de LukED proporciona una explicación de la capacidad de esta toxina para matar leucocitos que carecen de CCR5 (Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for Staphylococcus aureus Leukotoxin ED", Nature 493: 51-55 (2013)). Dado que los PMN son los primeros en responder a la infección y los defectos en la función de PMN resultan en una susceptibilidad extraordinaria a la infección por *S. aureus* (Rigby & DeLeo, "Neutrophils in Innate Host Defense Against Staphylococcus aureus Infections", Semin. Immunopathol. 34: 237-259 (2012)), es lógico que un patógeno como *S. aureus* elabore factores de virulencia tal como LukED para matar estas células. Sin embargo, la función sostenida de los PMN también depende de su reclutamiento continuo y de una mayor potencia o vida útil a través de mediadores inflamatorios secretados en los sitios de infección. De hecho, la interrupción cuantitativa y cualitativa de los neutrófilos o las células T, especialmente los subconjuntos efectores que secretan IL-17 o IFN $\gamma$ , aumentan en gran medida la susceptibilidad a la infección por *S. aureus* (Alonzo et al., "Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth in Vivo", Mol. Microbiol. 83: 423-435 (2012); Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for Staphylococcus aureus Leukotoxin ED", Nature 493: 51-55 (2013); Cho et al., "IL-17 is Essential for Host Defense Against Cutaneous Staphylococcus aureus Infection in Mice", J. Clin. Invest. 120: 1762-1773 (2010); Lin. et al., "Th1-Th17 Cells Mediate Protective Adaptive Immunity Against Staphylococcus aureus and Candida Albicans Infection in Mice", PLoS Pathog. 5: e1000703 (2009)). Como tal, LukED ataca únicamente a ambos brazos de la defensa inmune a través del reconocimiento de diversos receptores de quimiocinas del huésped. Mediante el uso de CXCR1/CXCR2, LukED ataca principalmente a las defensas innatas, neutrófilos, monocitos y células NK. Mientras que al atacar a las células CCR5+, LukED elimina los subconjuntos de células T (células Th1 y Th17) y las células profesionales presentadoras de antígeno (Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for Staphylococcus aureus Leukotoxin ED", Nature 493: 51-55 (2013)), todas las cuales son críticas en la inmunidad anti-Staph. Debido a la naturaleza temporal de la respuesta inmune del huésped y los diversos tipos de células involucradas en la resolución de la infección, el bloqueo del LukED que ataca a CXCR1/CXCR2 o CCR5 (Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for Staphylococcus aureus Leukotoxin ED", Nature 493: 51-55 (2013)) conduce a una mayor supervivencia *in vivo*. Por lo tanto, los hallazgos descritos en este documento sugieren que las estrategias para bloquear LukED serían un enfoque terapéutico o preventivo eficaz contra la infección de humanos por *S. aureus* que amenaza la vida.

45 Ejemplo 6: se requieren residuos de aminoácidos HlgA 180-192 en la región 4 de divergencia para HlgAB que ataca a neutrófilos humanos (hPMN), células CXCR1/CXCR2+

[LukE y HlgA comparten más del 70% de identidad de aminoácidos y ambos atacan a los receptores de CXCR1 y CXCR2 para matar los hPMN. Para evaluar si los aminoácidos en HlgA correspondientes al dominio DR4 de LukE (es decir, los aminoácidos 180-192 de HlgA) también están involucrados en el ataque de CXCR1/CXCR2, se modificaron varias proteínas HlgA híbridas. El dominio DR4 de HlgA se intercambió con los dominios DR4 de LukE (HlgA<sup>LukE-DR4</sup>) o LukS-PV (HlgA<sup>LukS-DR4</sup>). Las proteínas híbridas HlgA<sup>LukE-DR4</sup> y HlgA<sup>LukS-DR4</sup> se purificaron, se mezclaron en una proporción equimolar con HlgB y se incubaron con los hPMN para evaluar su actividad citotóxica. Los residuos de aminoácidos 180-192 de HlgA en la Región 4 de divergencia son necesarios para que HlgAB ataque neutrófilos  
50 humanos (hPMN), células CXCR1/CXCR2+ (Figura 14). Las combinaciones HlgA/HlgB y HlgA<sup>LukE-DR4</sup>/HlgB exhibieron una potente actividad citotóxica contra los hPMN, pero no la combinación HlgA<sup>LukS-DR4</sup>/HlgB. Estos datos demuestran que, al igual que con LukED, el dominio DR4 de HlgA está involucrado en el ataque de CXCR1 y CXCR2.

60 Ejemplo 7: los aminoácidos de LukE P184, G186, P187 y G189 dentro del dominio DR4 son necesarios para atacar y matar hPMN y para la mortalidad mediada por LukED tras la intoxicación del torrente sanguíneo

Se demostró que LukE se une a las células CXCR1/CXCR2+ a través del dominio DR4 y que el cambio de este dominio con el DR4 de LukS-PV deja a LukED inactivo hacia las células CXCR1/CXCR2+, incluidos los neutrófilos humanos (Figuras 9A-9H). También se descubrió que el dominio DR4 en HlgA era necesario para que HlgAB ataque y mate neutrófilos humanos (Figura 14). El DR4 de LukE forma un bucle que contiene dos residuos de glicina (G186 y G189) y dos residuos de prolina (P184 y P187) que presentan una superficie polar suficientemente distinta de la de

DR4 de LukS-PV, lo que probablemente determina el tropismo de LukE hacia CXCR1 y CXCR2. Curiosamente, tres de estos cuatro aminoácidos también se conservan en HlgA. Para evaluar directamente la participación de P184, G186, P187 y G189 en la muerte de hPMN mediada por LukED, los cuatro aminoácidos se mutaron a alanina dando como resultado la proteína LukE<sup>P184A,G186A,P187A,G189A</sup> (LukE<sup>P184,G186,P187</sup>). Las proteínas LukE de tipo silvestre y LukE<sup>P184,G186,P187,G189</sup> se purificaron, se mezclaron en proporción equimolar con LukD y se incubaron con hPMN humanos para evaluar su actividad citotóxica. Mientras que la toxina LukED de tipo silvestre atacó y mató a los hPMN, no se observó actividad detectable para la toxina LukE<sup>P184,G186,P187,G189</sup>/LukD (Figura 15A). Estos datos demuestran la importancia de la superficie polar creada por los aminoácidos P184, G186, P187 y G189 para la muerte mediada por LukED de las células CXCR1/CXCR2+. Se predice que los residuos de HlgA correspondientes a LukE P184, G186 y P187 juegan un papel similar en la unión de HlgA a CXCR1/CXCR2.

LukED es una leucotoxina implicada en la letalidad observada en ratones infectados por vía intravenosa con *S. aureus* (Alonzo et al., "Staphylococcus aureus Leucocidin ED Contributes to Systemic Infection by Targeting Neutrophils and Promoting Bacterial Growth In Vivo", Mol. Microbiol. 83 (2): 423-35 (2012); Alonzo et al., "CCR5 is a Receptor for Staphylococcus aureus Leukotoxin ED", Nature 493 (7430): 51-5 (2013); Reyes-Robles et al. "Staphylococcus aureus Leukotoxin ED Targets the Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 to Kill Leukocytes and Promote Infection", Cell Host Microbe. 14 (4): 453-9 (2013)). Para seguir estudiando los efectos directos de esta toxina *in vivo*, los ratones fueron inyectados por vía intravenosa con LukED purificado. Se observó que la administración de la toxina de tipo silvestre a concentraciones superiores a 10 µg de cada subunidad en un ratón de 20 g resultó en la muerte rápida del animal "intoxicado" (Figura 15B). Para examinar la contribución del ataque de CXCR1/CXCR2 a esta letalidad mediada por LukED, también se probaron los efectos *in vivo* de las toxinas LukE<sup>LukS-DR4</sup>/LukD y LukE<sup>P184,G186,P187,G189</sup>/LukD. De acuerdo con la importancia del ataque de CXCR1/CXCR2 por LukED a la letalidad observada con la infección del torrente sanguíneo por *S. aureus* (Reyes-Robles et al., "Staphylococcus aureus Leukotoxin ED Targets the Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 to Kill Leukocytes and Promote Infection", Cell Host Microbe.14 (4): 453-9 (2013)), las mutaciones que perjudicaron el ataque con LukED de las células CXCR1/CXCR2+ eliminaron el efecto letal de la toxina (Figura 15B).

Ejemplo 8: La lisis mediada por LukED de glóbulos rojos humanos depende de DARC y podría bloquearse con DARC purificado y anticuerpos anti-DARC

La transfección de células HEK293T con plásmidos que expresan DARC es suficiente para hacer que estas células sean susceptibles a LukED y HlgAB (Figuras 3 y 4A). Al probar la actividad hemolítica de LukED hacia los glóbulos rojos humanos (RBC), se observó que algunos donantes eran susceptibles a la hemólisis de LukED mientras que otros no (Figuras 16A y 16B). La evaluación de los niveles de DARC en la superficie de los glóbulos rojos por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) reveló que la resistencia a LukED estaba vinculada a DARC no detectable en la superficie de estos glóbulos rojos, lo que sugiere que se requiere DARC para la lisis mediada por LukED de glóbulos rojos.

Se ha planteado la hipótesis de que la lisis de los glóbulos rojos es necesaria para la patogénesis de *S. aureus*, debido a la liberación de hemoglobina, una fuente rica de hierro, un metal crítico para el crecimiento de *S. aureus*. Por lo tanto, bloquear la capacidad de *S. aureus* para lisar los glóbulos rojos inhibirá la liberación de hemoglobina disminuyendo el crecimiento bacteriano. La identificación de DARC como un factor celular requerido para la hemólisis mediada por LukED y HlgAB sugiere que el bloqueo de la interacción toxina-receptor es probable que proteja los glóbulos rojos de estas toxinas. Para probar esta hipótesis, LukED se incubó con tampón o con concentraciones crecientes de DARC purificado (OriGene Technologies Inc.) antes de la incubación con glóbulos rojos humanos. Se encontró que DARC era capaz de neutralizar completamente la lisis mediada por LukED de los glóbulos rojos (Figura 16C). Además, el tratamiento de glóbulos rojos humanos con un anticuerpo monoclonal anti-DARC humano (clon # 358307; R&D Systems<sup>MR</sup>) también protegió los glóbulos rojos humanos de la lisis mediada por LukED (Figura 16D). En conjunto, estos hallazgos demuestran que los glóbulos rojos humanos podrían protegerse de LukED, y muy probablemente la lisis mediada por HlgAB de los glóbulos rojos humanos por DARC purificado o anticuerpos dirigidos contra este receptor.

Listado de secuencias

<110> New York University

<120> FACTORES CELULARES INVOLUCRADOS EN LA CITOTOXICIDAD DE LAS LEUCOCIDINAS DE ESTAFILOCOCO AUREO: NUEVOS OBJETIVOS TERAPÉUTICOS

<130> 4040/4052PEPDiv

<150> US61836516

<151> 2013-06-18

<160> 58

ES 2 811 527 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 72

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

10

<223> CXCL8(3-74)K11R/G31P

<400> 1

Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Arg Thr His Ser Thr Pro Phe His  
1 5 10 15

Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Pro Pro His Cys  
20 25 30

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

Leu Asn Pro Lys Glu Lys Trp Val Gln Lys Val Val Gln Val Phe Val  
50 55 60

Lys Arg Ala Glu Lys Gln Asp Pro  
65 70

15 <210> 2

<211> 72

<212> PRT

<213> artificial

20

<220>

<223> CXCL8(3-74)K11R/G31P/P32G

<400> 2

Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Arg Thr His Ser Thr Pro Phe His  
1 5 10 15

25

Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Gly His Cys  
20 25 30

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

Leu Asn Pro Lys Glu Lys Trp Val Gln Lys Val Val Gln Val Phe Val  
50 55 60

Lys Arg Ala Glu Lys Gln Asp Pro  
65 70

30

<210> 3

<211> 72

<212> PRT

<213> artificial

ES 2 811 527 T3

<220>

<223> CXCL8(3-74)K11R/T12S/H13F/G31P

5 <400> 3

Thr Glu Leu Arg Cys Gln Cys Ile Arg Ser Pro Ser Thr Pro Phe His  
1 5 10 15

Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Pro Pro His Cys  
20 25 30

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

Leu Asn Pro Lys Glu Lys Trp Val Gln Lys Val Val Gln Val Phe Val  
50 55 60

Lys Arg Ala Glu Lys Gln Asp Pro  
65 70

<210> 4

10 <211> 283

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 4

15

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

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

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

Lys Met Gln Gly Phe Ile Asn Ser Arg Thr Ser Phe Ser Asp Val Lys

ES 2 811 527 T3

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

5 <210> 5  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*

ES 2 811 527 T3

<400> 5

Gln Ser Pro Asn Gly Pro Thr Gly Ser Ala Arg Glu Tyr Phe Ala  
 1 5 10 15

5

<210> 6

<211> 280

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

10

<400> 6

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

Thr Gln Asp Ile Thr Ser Lys Arg Leu Ala Ile Thr Gln Asn Ile Gln  
 20 25 30

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

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

Lys Tyr Pro Tyr Ile Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile  
 65 70 75 80

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

Lys Asn Lys Ile Asp Ser Ala Asp Val Ser Gln Lys Leu Gly Tyr Asn  
 100 105 110

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

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

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

Asn Ser Phe Val Thr Pro Asn Gly Gln Val Ser Ala Tyr Asp Gln Tyr  
 165 170 175

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

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Ile Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser

ES 2 811 527 T3

195

200

205

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Arg Gly Lys Gly Asp Lys Ser Glu  
210 215 220

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

Thr Arg His Arg Leu Ala Val Asp Arg Lys His Asp Ala Phe Lys Asn  
245 250 255

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

Lys Ile Lys Ser Ile Thr Pro Lys  
275 280

<210> 7

5 <211> 13

<212> PRT

<213> *Staphylococcus aureus*

<400> 7

10

Gln Asp Pro Thr Gly Pro Ala Ala Arg Asp Tyr Phe Val  
1 5 10

<210> 8

15 <211> 282

<212> PRT

<213> artificial

<220>

20 <223> LukELukS-DR4

<400> 8

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

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

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

Lys Met Gln Gly Phe Ile Asn Ser Arg Thr Ser Phe Ser Asp Val Lys  
50 55 60

Gly Ser Gly Tyr Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr  
65 70 75 80

ES 2 811 527 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 9  
<211> 243  
<212> PRT  
<213> artificial

10 <220>  
<223> LukE20-263 LukS-DR4

<400> 9

ES 2 811 527 T3

Val Ser Ser Lys Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Val Gln Phe Asp Phe  
 1 5 10 15  
 Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Val Lys Met Gln  
 20 25 30  
 Gly Phe Ile Asn Ser Arg Thr Ser Phe Ser Asp Val Lys Gly Ser Gly  
 35 40 45  
 Tyr Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile Gly  
 50 55 60  
 Leu Thr Thr Lys Asp Pro Asn Val Ser Leu Ile Asn Tyr Leu Pro Lys  
 65 70 75 80  
 Asn Lys Ile Glu Thr Thr Asp Val Gly Gln Thr Leu Gly Tyr Asn Ile  
 85 90 95  
 Gly Gly Asn Phe Gln Ser Ala Pro Ser Ile Gly Gly Asn Gly Ser Phe  
 100 105 110  
 Asn Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Thr Gln Lys Ser Tyr Val Ser Glu  
 115 120 125  
 Val Asp Lys Gln Asn Ser Lys Ser Val Lys Trp Gly Val Lys Ala Asn  
 130 135 140  
 Glu Phe Val Thr Pro Asp Gly Lys Lys Ser Ala His Asp Arg Tyr Leu  
 145 150 155 160  
 Phe Val Gly Tyr Lys Pro Tyr Ser Gln Asn Pro Arg Asp Tyr Phe Val  
 165 170 175  
 Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Val Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser  
 180 185 190  
 Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Lys Gly Ser Ser Asp Thr Ser Glu  
 195 200 205  
 Phe Glu Ile Ser Tyr Gly Arg Asn Leu Asp Ile Thr Tyr Ala Thr Leu  
 210 215 220  
 Phe Pro Arg Thr Gly Ile Tyr Ala Glu Arg Lys His Asn Ala Phe Val  
 225 230 235 240  
 Asn Arg Asn

ES 2 811 527 T3

<210> 10  
 <211> 283  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> LukEP184A,G186A,P187A

<400> 10

10

```

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

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

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

Lys Met Gln Gly Phe Ile Asn Ser Arg Thr Ser Phe Ser Asp Val Lys
          50          55          60

Gly Ser Gly Tyr Glu Leu Thr Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr
65          70          75          80

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 811 527 T3

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

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

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

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

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

- 5 <210> 11
- <211> 283
- <212> PRT
- <213> artificial

- 10 <220>
- <223> LukEP184A,G186A,P187A,G189A
- <400> 11

ES 2 811 527 T3

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

ES 2 811 527 T3

130						135						140					
Val	Ser	Glu	Val	Asp	Lys	Gln	Asn	Ser	Lys	Ser	Val	Lys	Trp	Gly	Val		
145					150					155					160		
Lys	Ala	Asn	Glu	Phe	Val	Thr	Pro	Asp	Gly	Lys	Lys	Ser	Ala	His	Asp		
				165					170					175			
Arg	Tyr	Leu	Phe	Val	Gln	Ser	Ala	Asn	Ala	Ala	Thr	Ala	Ser	Ala	Arg		
			180					185					190				
Glu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Asp	Asn	Gln	Leu	Pro	Pro	Leu	Val	Gln	Ser	Gly		
		195					200					205					
Phe	Asn	Pro	Ser	Phe	Ile	Thr	Thr	Leu	Ser	His	Glu	Lys	Gly	Ser	Ser		
210						215					220						
Asp	Thr	Ser	Glu	Phe	Glu	Ile	Ser	Tyr	Gly	Arg	Asn	Leu	Asp	Ile	Thr		
225					230					235					240		
Tyr	Ala	Thr	Leu	Phe	Pro	Arg	Thr	Gly	Ile	Tyr	Ala	Glu	Arg	Lys	His		
				245					250					255			
Asn	Ala	Phe	Val	Asn	Arg	Asn	Phe	Val	Val	Arg	Tyr	Glu	Val	Asn	Trp		
			260					265					270				
Lys	Thr	His	Glu	Ile	Lys	Val	Lys	Gly	His	Asn							
		275					280										

5 <210> 12  
 <211> 301  
 <212> PRT  
 <213> *Staphylococcus aureus*

10 <400> 12

Ala	Gln	His	Ile	Thr	Pro	Val	Ser	Glu	Lys	Lys	Val	Asp	Asp	Lys	Ile		
1				5					10					15			
Thr	Leu	Tyr	Lys	Thr	Thr	Ala	Thr	Ser	Asp	Asn	Asp	Lys	Leu	Asn	Ile		
			20					25					30				
Ser	Gln	Ile	Leu	Thr	Phe	Asn	Phe	Ile	Lys	Asp	Lys	Ser	Tyr	Asp	Lys		
		35					40					45					
Asp	Thr	Leu	Val	Leu	Lys	Ala	Ala	Gly	Asn	Ile	Asn	Ser	Gly	Tyr	Lys		
50						55					60						
Lys	Pro	Asn	Pro	Lys	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Ser	Gln	Phe	Tyr	Trp	Gly	Gly		



ES 2 811 527 T3

<220>

<223> HlgALukS-DR4

<400> 13

5

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

Thr Gln Asp Ile Thr Ser Lys Arg Leu Ala Ile Thr Gln Asn Ile Gln  
 20 25 30

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

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

Lys Tyr Pro Tyr Ile Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile  
 65 70 75 80

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

Lys Asn Lys Ile Asp Ser Ala Asp Val Ser Gln Lys Leu Gly Tyr Asn  
 100 105 110

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

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

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

Asn Ser Phe Val Thr Pro Asn Gly Gln Val Ser Ala Tyr Asp Gln Tyr  
 165 170 175

Leu Phe Ala Gly Tyr Lys Pro Tyr Ser Gln Asn Pro Arg Asp Tyr Phe  
 180 185 190

Val Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Ile Gln Ser Gly Phe Asn Pro  
 195 200 205

Ser Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Arg Gly Lys Gly Asp Lys Ser  
 210 215 220

Glu Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn Met Asp Ala Thr Tyr Ala Tyr



ES 2 811 527 T3

Gly Tyr Lys Pro Tyr Ser Gln Asn Pro Arg Asp Tyr Phe Val Pro Asp  
 165 170 175

Asn Gln Leu Pro Pro Leu Ile Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser Phe Ile  
 180 185 190

Thr Thr Leu Ser His Glu Arg Gly Lys Gly Asp Lys Ser Glu Phe Glu  
 195 200 205

Ile Thr Tyr Gly Arg Asn Met Asp Ala Thr Tyr Ala Tyr Val Thr Arg  
 210 215 220

His Arg Leu Ala Val Asp Arg Lys His Asp Ala Phe Lys Asn Arg Asn  
 225 230 235 240

5 <210> 15  
 <211> 280  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> HlgAP182A,G184A,P185A  
 <400> 15

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

Thr Gln Asp Ile Thr Ser Lys Arg Leu Ala Ile Thr Gln Asn Ile Gln  
 20 25 30

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

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

Lys Tyr Pro Tyr Ile Lys Arg Met Ile Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile  
 65 70 75 80

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

Lys Asn Lys Ile Asp Ser Ala Asp Val Ser Gln Lys Leu Gly Tyr Asn  
 100 105 110

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

15

ES 2 811 527 T3

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

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

Asn Ser Phe Val Thr Pro Asn Gly Gln Val Ser Ala Tyr Asp Gln Tyr  
 165 170 175

Leu Phe Ala Gln Asp Ala Thr Ala Ala Ala Arg Asp Tyr Phe Val  
 180 185 190

Pro Asp Asn Gln Leu Pro Pro Leu Ile Gln Ser Gly Phe Asn Pro Ser  
 195 200 205

Phe Ile Thr Thr Leu Ser His Glu Arg Gly Lys Gly Asp Lys Ser Glu  
 210 215 220

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

Thr Arg His Arg Leu Ala Val Asp Arg Lys His Asp Ala Phe Lys Asn  
 245 250 255

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

Lys Ile Lys Ser Ile Thr Pro Lys  
 275 280

- <210> 16
- 5 <211> 299
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- 10 <223> HlgB
- <400> 16

ES 2 811 527 T3

Glu Gly Lys Ile Thr Pro Val Ser Val Lys Lys Val Asp Asp Lys Val  
1 5 10 15

Thr Leu Tyr Lys Thr Thr Ala Thr Ala Asp Ser Asp Lys Phe Lys Ile  
20 25 30

Ser Gln Ile Leu Thr Phe Asn Phe Ile Lys Asp Lys Ser Tyr Asp Lys  
35 40 45

ES 2 811 527 T3

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

Lys Pro Asn Pro Asn Asp Tyr Asp Phe Ser Lys Leu Tyr Trp Gly Ala  
65 70 75 80

Lys Tyr Asn Val Ser Ile Ser Ser Gln Ser Asn Asp Ser Val Asn Val  
85 90 95

Val Asp Tyr Ala Pro Lys Asn Gln Asn Glu Glu Phe Gln Val Gln Asn  
100 105 110

Thr Leu Gly Tyr Thr Phe Gly Gly Asp Ile Ser Ile Ser Asn Gly Leu  
115 120 125

Ser Gly Gly Leu Asn Gly Asn Thr Ala Phe Ser Glu Thr Ile Asn Tyr  
130 135 140

Lys Gln Glu Ser Tyr Arg Thr Thr Leu Ser Arg Asn Thr Asn Tyr Lys  
145 150 155 160

Asn Val Gly Trp Gly Val Glu Ala His Lys Ile Met Asn Asn Gly Trp  
165 170 175

Gly Pro Tyr Gly Arg Asp Ser Phe His Pro Thr Tyr Gly Asn Glu Leu  
180 185 190

Phe Leu Ala Gly Arg Gln Ser Ser Ala Tyr Ala Gly Gln Asn Phe Ile  
195 200 205

Ala Gln His Gln Met Pro Leu Leu Ser Arg Ser Asn Phe Asn Pro Glu  
210 215 220

Phe Leu Ser Val Leu Ser His Arg Gln Asp Gly Ala Lys Lys Ser Lys  
225 230 235 240

Ile Thr Val Thr Tyr Gln Arg Glu Met Asp Leu Tyr Gln Ile Arg Trp  
245 250 255

Asn Gly Phe Tyr Trp Ala Gly Ala Asn Tyr Lys Asn Phe Lys Thr Arg  
260 265 270

Thr Phe Lys Ser Thr Tyr Glu Ile Asp Trp Glu Asn His Lys Val Lys  
275 280 285

Leu Leu Asp Thr Lys Glu Thr Glu Asn Asn Lys  
290 295

<210> 17  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 17  
 5 cccctcgag aatactaata ttgaaaatat tggatgat 38

<210> 18  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 18  
 15 gtaataagta gtcttgaat taataaaacc ttgcatttta ac 42

<210> 19  
 <211> 40  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 19  
 25 catataaaag caatgaggtg gccattcaa tataatatag 40

<210> 20  
 <211> 54  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 20  
 35 tcaaagacta cttattacaa ttacaaaaac acagatcata taaagcaat gagg 54

<210> 21  
 <211> 54  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 21  
 45 cctcattgct ttatatgat ctgtgtttt gtaattgtaa taagtagtct ttga 54

<210> 22  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 22  
 55 gttttgtga ttataactaa ttgttttaga ataattaaat g 41

<210> 23  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

ES 2 811 527 T3

<220>  
 <223> Cebador

<400> 23  
 5 gaacgtcaaa attcaaaatc tgtaaattgg ggtg 34

<210> 24  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 24  
 15 agttataatc aacaaaaacta tatcagtgaa gtagaacgtc aaaattca 48

<210> 25  
 <211> 48  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 25  
 25 tgaatttga cgttctact cactgatata gtttggta ttataact 48

<210> 26  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 26  
 35 gtgataaatg aattagctt aacaccccat ttaac 35

<210> 27  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 27  
 50 gtaaaatgtc tggacatgat ccaaattat ttgtgg 37

<210> 28  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 28  
 60 gctaattcat ttatcacatc attaggtaaa atgtctggac atgat 45

<210> 29  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

ES 2 811 527 T3

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 29  
 5 atcatgtcca gacattttac ctaatgatgt gataaatgaa ttagc 45  
  
 <210> 30  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 30  
 15 ctatattggtt tatatccaac aaataaatat ctatcatgcg caga 44  
  
 <210> 31  
 <211> 44  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 31  
 25 gactattttg ttccagacaa tcaattgcca ccttagttc aaag 44  
  
 <210> 32  
 <211> 52  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 32  
 35 tgttgatata aaaccatata gtcaaatcc gagagactat tttgtccag ac 52  
  
 <210> 33  
 <211> 52  
 40 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 33  
 45 gcttgggaaca aaatagtctc tcggatttg actatatggt ttatatccaa ca 52  
  
 <210> 34  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 34  
 60 catgagtaac atccatattt ctacatgatg aaatttcaaa ttc 43  
  
 <210> 35  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

ES 2 811 527 T3

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 35  
 5 gagactattt tgtccagat aatcaattgc caccttag 39  
  
 <210> 36  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 36  
 15 gaattgaaa tttcatatgg tagaaatag gatgttactc atg 43  
  
 <210> 37  
 <211> 43  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 37  
 25 caaagtttct atttacaat gcattgtgta ttctagatcc ttc 43  
  
 <210> 38  
 <211> 38  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 38  
 ccccgatcc ttaattatgt cctttcactt taatttcg 38  
  
 <210> 39  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 39  
 50 ccccctgcag gatagtgag atgcatacac aac 33  
  
 <210> 40  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 40  
 60 ccccgatcc ttatactcca ggattagttt cttag 36  
  
 <210> 41  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 41  
 5 caatatttc aatattagta ttgcctag attctgaat cggaga 46

<210> 42  
 <211> 46  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 42  
 15 tctccgattc aagaatctag agcaaatact aatattgaaa atattg 46

<210> 43  
 <211> 41  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 43  
 25 actaattttt tcatttcat attaattatg tcctttcact t 41

<210> 44  
 <211> 41  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 44  
 35 aagtgaagg acataattaa tatgaaaatg aaaaaattag t 41

<210> 45  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 45  
 50 cccggatcca atactaatat tgaaaatatt ggtgatg 37

<210> 46  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 46  
 60 cccctgcagt tatactccag gattagtctc ttag 35

<210> 47  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

ES 2 811 527 T3

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 47  
 5 cccggatcca atactaatat tgaaaatatt ggtgatg 37  
  
 <210> 48  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 48  
 15 cccggatccg aaaataagat agaagatc ggcc 34  
  
 <210> 49  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 49  
 25 cccctgcagt taattatgct cttcacttt aatttcg 37  
  
 <210> 50  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 50  
 35 gcaaaaatatt ctctgctga tgctgtgct gcattgcac ttgtacgaa taaatc 58  
  
 <210> 51  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 51  
 50 gatatttatt cgtacaaagt gcaaatgcag caacagcatc agcaagagaa tattttgc 58  
  
 <210> 52  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 52  
 60 cccctgcagt tacttagtg tgatgctttt aattttac 39  
  
 <210> 53  
 <211> 62  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

ES 2 811 527 T3

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 53  
 5 ggataaac catatagca aaatccgaga gactatttg ttccagataa tcaactacct 60  
 cc 62  
  
 <210> 54  
 10 <211> 66  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 15 <223> Cebador  
  
 <400> 54  
 acaaaaatag tctctcggat ttgactata tggttatat cctgcaaata agtattgatc 60  
 atatgc 66  
 20  
 <210> 55  
 <211> 65  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 55  
 30 caaagtccaa atggtccaac aggttcagca agagaatatt ttgctccaga taatcaacta 60  
 cctcc 65  
  
 <210> 56  
 35 <211> 69  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 40 <223> Cebador  
  
 <400> 56  
 agcaaaaat tctcttgctg aacctgttg accatttga cttgtgcaa ataagtattg 60  
 atcatatgc 69  
 45  
 <210> 57  
 <211> 284  
 <212> PRT  
 50 <213> *Staphylococcus aureus*  
 <400> 57

ES 2 811 527 T3

Asp Asn Asn Ile Glu Asn Ile Gly Asp Gly Ala Glu Val Val Lys Arg  
 1 5 10 15  
 Thr Glu Asp Thr Ser Ser Asp Lys Trp Gly Val Thr Gln Asn Ile Gln  
 20 25 30  
 Phe Asp Phe Val Lys Asp Lys Lys Tyr Asn Lys Asp Ala Leu Ile Leu  
 35 40 45  
 Lys Met Gln Gly Phe Ile Asn Ser Lys Thr Thr Tyr Tyr Asn Tyr Lys  
 50 55 60  
 Asn Thr Asp His Ile Lys Ala Met Arg Trp Pro Phe Gln Tyr Asn Ile  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Lys Thr Asn Asp Pro Asn Val Asp Leu Ile Asn Tyr Leu Pro  
 85 90 95  
 Lys Asn Lys Ile Asp Ser Val Asn Val Ser Gln Thr Leu Gly Tyr Asn  
 100 105 110  
 Ile Gly Gly Asn Phe Asn Ser Gly Pro Ser Thr Gly Gly Asn Gly Ser  
 115 120 125  
 Phe Asn Tyr Ser Lys Thr Ile Ser Tyr Asn Gln Gln Asn Tyr Ile Ser  
 130 135 140  
 Glu Val Glu Arg Gln Asn Ser Lys Ser Val Gln Trp Gly Ile Lys Ala  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Phe Ile Thr Ser Leu Gly Lys Met Ser Gly His Asp Pro Asn  
 165 170 175  
 Leu Phe Val Gly Tyr Lys Pro Tyr Ser Gln Asn Pro Arg Asp Tyr Phe  
 180 185 190  
 Val Pro Asp Asn Glu Leu Pro Pro Leu Val His Ser Gly Phe Asn Pro  
 195 200 205  
 Ser Phe Ile Ala Thr Val Ser His Glu Lys Gly Ser Gly Asp Thr Ser  
 210 215 220  
 Glu Phe Glu Ile Thr Tyr Gly Arg Asn Met Asp Val Thr His Ala Thr  
 225 230 235 240  
 Arg Arg Thr Thr His Tyr Gly Asn Ser Tyr Leu Glu Gly Ser Arg Ile  
 245 250 255  
 His Asn Ala Phe Val Asn Arg Asn Tyr Thr Val Lys Tyr Glu Val Asn  
 260 265 270  
 Trp Lys Thr His Glu Ile Lys Val Lys Gly His Asn  
 275 280

5 <210> 58  
<211> 287

- <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
5 <223> Secuencia consenso de leucocidina
- <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (1)..(1)  
10 <223> Xaa en la posición 1 puede ser D o N
- <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (2)..(2)  
15 <223> Xaa en la posición 2 puede ser N o T
- <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (14)..(14)  
20 <223> Xaa en la posición 14 puede ser V o I
- <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (20)..(20)  
25 <223> Xaa en la posición 20 puede ser T o V
- <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (23)..(23)  
30 <223> Xaa en la posición 23 puede ser D o K
- <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (31)..(31)  
35 <223> Xaa en la posición 31 puede ser I o V
- <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (48)..(48)  
40 <223> Xaa en la posición 48 puede ser L o V
- <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (57)..(57)  
45 <223> Xaa en la posición 57 puede ser K o R
- <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (59)..(59)  
50 <223> Xaa en la posición 59 puede ser T o S
- <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (60)..(60)  
55 <223> Xaa en la posición 60 puede ser Y o F
- <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (61)..(61)  
60 <223> Xaa en la posición 61 puede ser Y o S
- <220>  
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
<222> (62)..(62)  
65 <223> Xaa en la posición 62 puede ser N o D

- 5  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (63)..(63)  
 <223> Xaa en la posición 63 puede ser Y o V
- 10  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (65)..(65)  
 <223> Xaa en la posición 65 puede ser N o G
- 15  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (66)..(66)  
 <223> Xaa en la posición 66 puede ser T o S
- 20  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (67)..(67)  
 <223> Xaa en la posición 67 puede ser D o G
- 25  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (68)..(68)  
 <223> Xaa en la posición 68 puede ser H o Y
- 30  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (69)..(69)  
 <223> Xaa en la posición 69 puede ser E
- 35  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (70)..(70)  
 <223> Xaa en la posición 70 puede ser L
- 40  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (71)..(71)  
 <223> Xaa en la posición 71 puede ser I o T
- 45  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (73)..(73)  
 <223> Xaa en la posición 73 puede ser A o R
- 50  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (75)..(75)  
 <223> Xaa en la posición 75 puede ser R o I
- 55  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (85)..(85)  
 <223> Xaa en la posición 85 puede ser K o T
- 60  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (87)..(87)  
 <223> Xaa en la posición 87 puede ser N o K
- 65  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (92)..(92)  
 <223> Xaa en la posición 92 puede ser S o D

- 5  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (103)..(103)  
 <223> Xaa en la posición 103 puede ser D o E
- 10  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (104)..(104)  
 <223> Xaa en la posición 104 puede ser S o T
- 15  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (105)..(105)  
 <223> Xaa en la posición 105 puede ser V o T
- 20  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (106)..(106)  
 <223> Xaa en la posición 106 puede ser N o D
- 25  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (108)..(108)  
 <223> Xaa en la posición 108 puede ser S o G
- 30  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (120)..(120)  
 <223> Xaa en la posición 120 puede ser N o Q
- 35  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (122)..(122)  
 <223> Xaa en la posición 122 puede ser G o A
- 40  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (125)..(125)  
 <223> Xaa en la posición 125 puede ser T o I
- 45  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (140)..(140)  
 <223> Xaa en la posición 140 puede ser N o T
- 50  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (142)..(142)  
 <223> Xaa en la posición 142 puede ser Q o K
- 55  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (143)..(143)  
 <223> Xaa en la posición 143 puede ser N o S
- 60  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (145)..(145)  
 <223> Xaa en la posición 145 puede ser I o V
- 65  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (149)..(149)  
 <223> Xaa en la posición 149 puede ser E o D

- 5
- <220>
  - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <222> (150)..(150)
  - <223> Xaa en la posición 150 puede ser R o K
- 10
- <220>
  - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <222> (157)..(157)
  - <223> Xaa en la posición 157 puede ser Q o K
- 15
- <220>
  - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <222> (160)..(160)
  - <223> Xaa en la posición 160 puede ser I o V
- 20
- <220>
  - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <222> (164)..(164)
  - <223> Xaa en la posición 164 puede ser S o E
- 25
- <220>
  - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <222> (166)..(166)
  - <223> Xaa en la posición 166 puede ser I o V
- 30
- <220>
  - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <222> (168)..(168)
  - <223> Xaa en la posición 168 puede ser S o P
- 35
- <220>
  - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <222> (169)..(169)
  - <223> Xaa en la posición 169 puede ser L o D
- 40
- <220>
  - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <222> (172)..(172)
  - <223> Xaa en la posición 172 puede ser M o K
- 45
- <220>
  - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <222> (174)..(174)
  - <223> Xaa en la posición 174 puede ser G o A
- 50
- <220>
  - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <222> (177)..(177)
  - <223> Xaa en la posición 177 puede ser P o R
- 55
- <220>
  - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <222> (178)..(178)
  - <223> Xaa en la posición 178 puede ser N o Y
- 60
- <220>
  - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <222> (182)..(182)
  - <223> Xaa en la posición 182 puede ser Q
- 65
- <220>
  - <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
  - <222> (183)..(183)
  - <223> Xaa en la posición 183 puede ser G o S

- 5  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (184)..(184)  
 <223> Xaa en la posición 184 puede ser Y o P
- 10  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (185)..(185)  
 <223> Xaa en la posición 185 puede ser K o N
- 15  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (186)..(186)  
 <223> Xaa en la posición 186 puede ser P o G
- 20  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (187)..(187)  
 <223> Xaa en la posición 187 puede ser Y o P
- 25  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (188)..(188)  
 <223> Xaa en la posición 188 puede ser S o T
- 30  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (189)..(189)  
 <223> Xaa en la posición 189 puede ser Q o G
- 35  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (190)..(190)  
 <223> Xaa en la posición 190 puede ser N o S
- 40  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (191)..(191)  
 <223> Xaa en la posición 191 puede ser P o A
- 45  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (193)..(193)  
 <223> Xaa en la posición 193 puede ser D o E
- 50  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (196)..(196)  
 <223> Xaa en la posición 196 puede ser V o A
- 55  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (200)..(200)  
 <223> Xaa en la posición 200 puede ser E o Q
- 60  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (206)..(206)  
 <223> Xaa en la posición 206 puede ser Q o H
- 65  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (215)..(215)  
 <223> Xaa en la posición 215 puede ser A o T

- 5  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (217)..(217)  
 <223> Xaa en la posición 217 puede ser V o L
- 10  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (224)..(224)  
 <223> Xaa en la posición 224 puede ser G o S
- 15  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (232)..(232)  
 <223> Xaa en la posición 232 puede ser T o S
- 20  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (237)..(237)  
 <223> Xaa en la posición 237 puede ser M o L
- 25  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (239)..(239)  
 <223> Xaa en la posición 239 puede ser V o I
- 30  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (241)..(241)  
 <223> Xaa en la posición 241 puede ser H o Y
- 35  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (244)..(244)  
 <223> Xaa en la posición 244 puede ser R o L
- 40  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (245)..(245)  
 <223> Xaa en la posición 245 puede ser R
- 45  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (246)..(246)  
 <223> Xaa en la posición 246 puede ser T
- 50  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (247)..(247)  
 <223> Xaa en la posición 247 puede ser T
- 55  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (248)..(248)  
 <223> Xaa en la posición 248 puede ser H
- 60  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (249)..(249)  
 <223> Xaa en la posición 249 puede ser Y o F
- 65  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (250)..(250)  
 <223> Xaa en la posición 250 puede ser G o P

<220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (251)..(251)  
 <223> Xaa en la posición 251 puede ser N o R  
 5  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (252)..(252)  
 <223> Xaa en la posición 252 puede ser S o T  
 10  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (253)..(253)  
 <223> Xaa en la posición 253 puede ser Y o G  
 15  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (254)..(254)  
 <223> Xaa en la posición 254 puede ser L o I  
 20  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (255)..(255)  
 <223> Xaa en la posición 255 puede ser E o Y  
 25  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (256)..(256)  
 <223> Xaa en la posición 256 puede ser G o A  
 30  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (257)..(257)  
 <223> Xaa en la posición 257 puede ser S o E  
 35  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (259)..(259)  
 <223> Xaa en la posición 259 puede ser I o K  
 40  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (268)..(268)  
 <223> Xaa en la posición 268 puede ser Y o F  
 45  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (269)..(269)  
 <223> Xaa en la posición 269 puede ser T o V  
 50  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA  
 <222> (271)..(271)  
 <223> Xaa en la posición 271 puede ser K o R  
 55  
 <400> 58

ES 2 811 527 T3

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

ES 2 811 527 T3

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

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

Xaa Ala Thr Xaa  
245 250 255

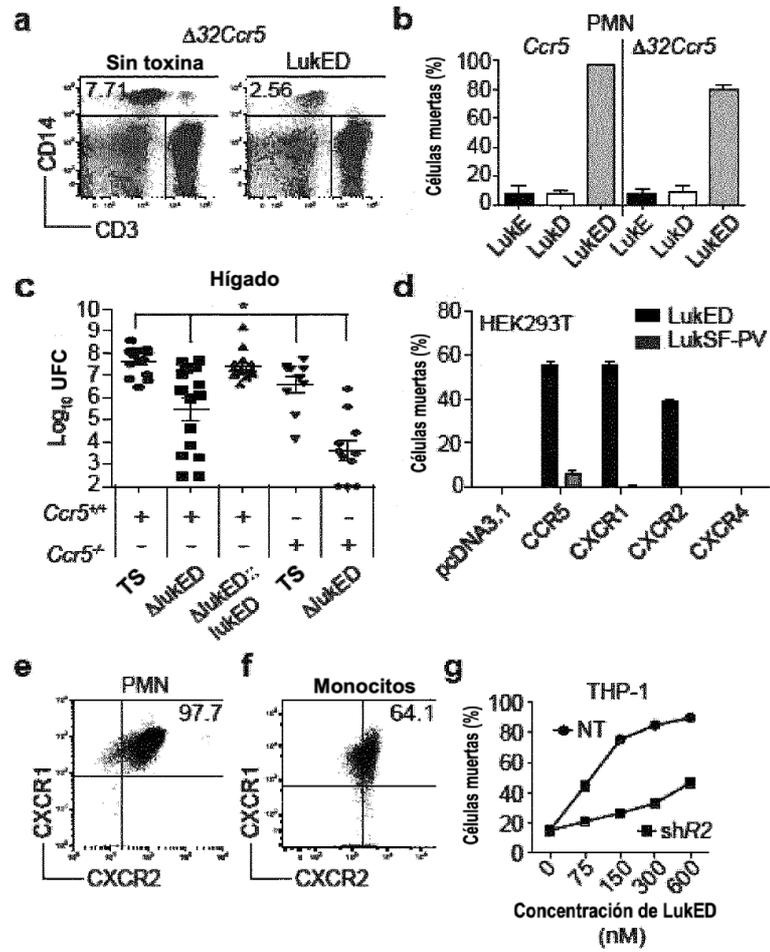
Xaa Arg Xaa His Asn Ala Phe Val Asn Arg Asn Xaa Xaa Val Xaa Tyr  
260 265 270

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

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende:

- 5 una proteína Leucocidina E (LukE) aislada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, o un polipéptido de la misma, que tiene un dominio de unión a CXCR1/CXCR2 no funcional, en la que uno o más residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 182-196 de la SEQ ID NO: 4 están sustituidos o eliminados; y,  
10 un portador farmacéuticamente aceptable.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el polipéptido LukE aislado comprende los residuos de aminoácidos 20-263 de la SEQ ID NO: 4, en la que uno o más residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 182-196 de la SEQ ID NO: 4 están sustituidos o eliminados.
- 15 3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en P184, G186, P187 y G189 de la SEQ ID NO: 4 están sustituidos o eliminados.
- 20 4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho polipéptido LukE aislado tiene una longitud de entre 50 y 100 aminoácidos.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho polipéptido LukE aislado tiene una longitud de entre 100 y 200 aminoácidos.
- 25 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho polipéptido LukE aislado tiene una longitud de entre 200 y 250 aminoácidos.
- 30 7. La composición de la reivindicación 2, en la que la proteína LukE aislada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9, o el polipéptido LukE aislado comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o la SEQ ID NO: 11.
8. La composición de la reivindicación 1, que comprende además una proteína Leucocidina D (LukD) aislada o un polipéptido de la misma.



Figuras 1A-1G

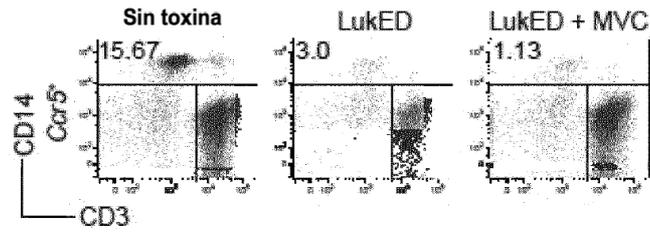


Figura 2

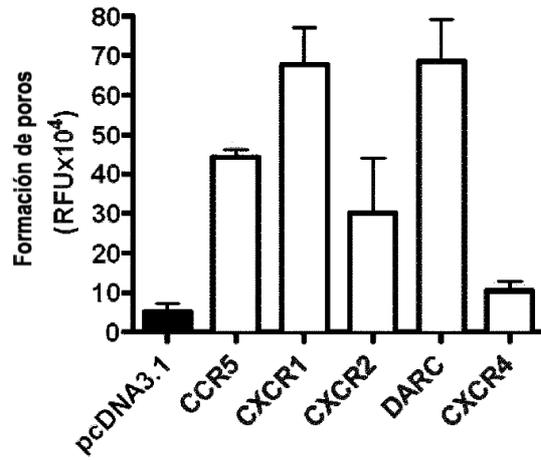
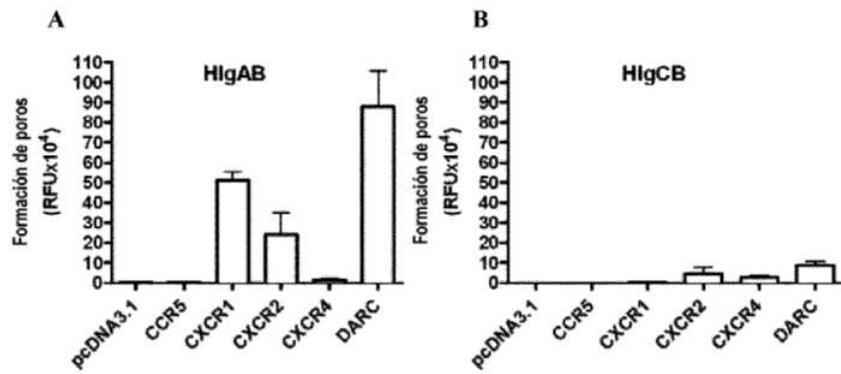
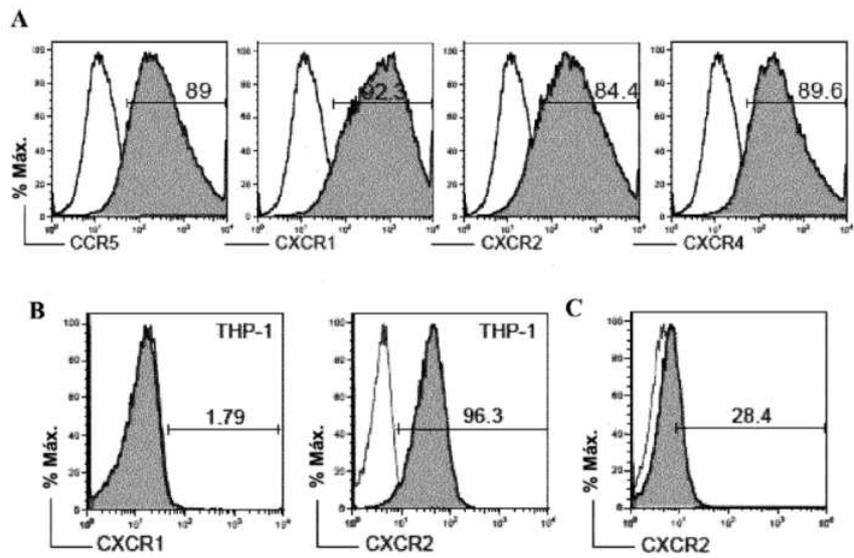


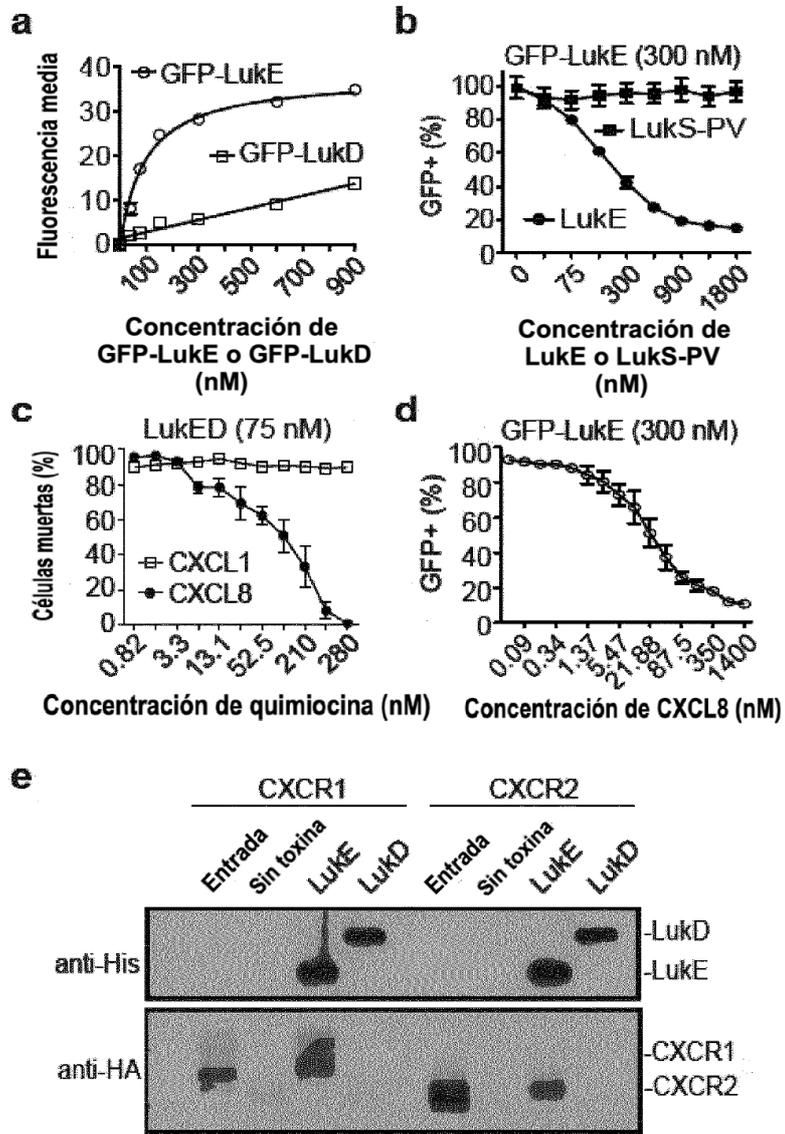
Figura 3



Figuras 4A-4B



Figuras 5A-5C



Figuras 6A-6E

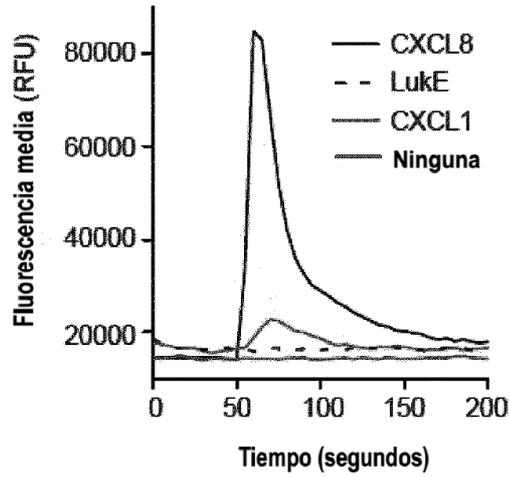


Figura 7

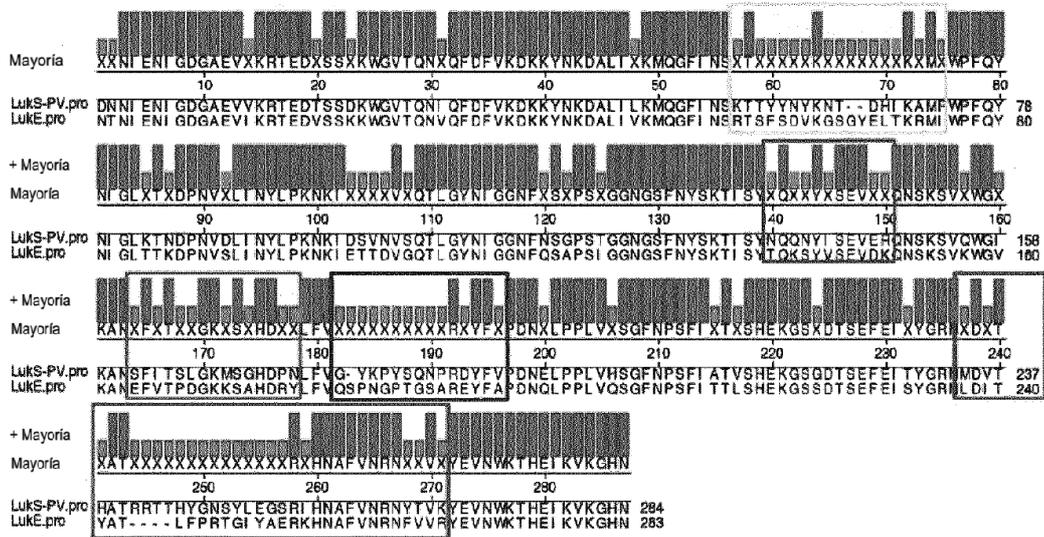
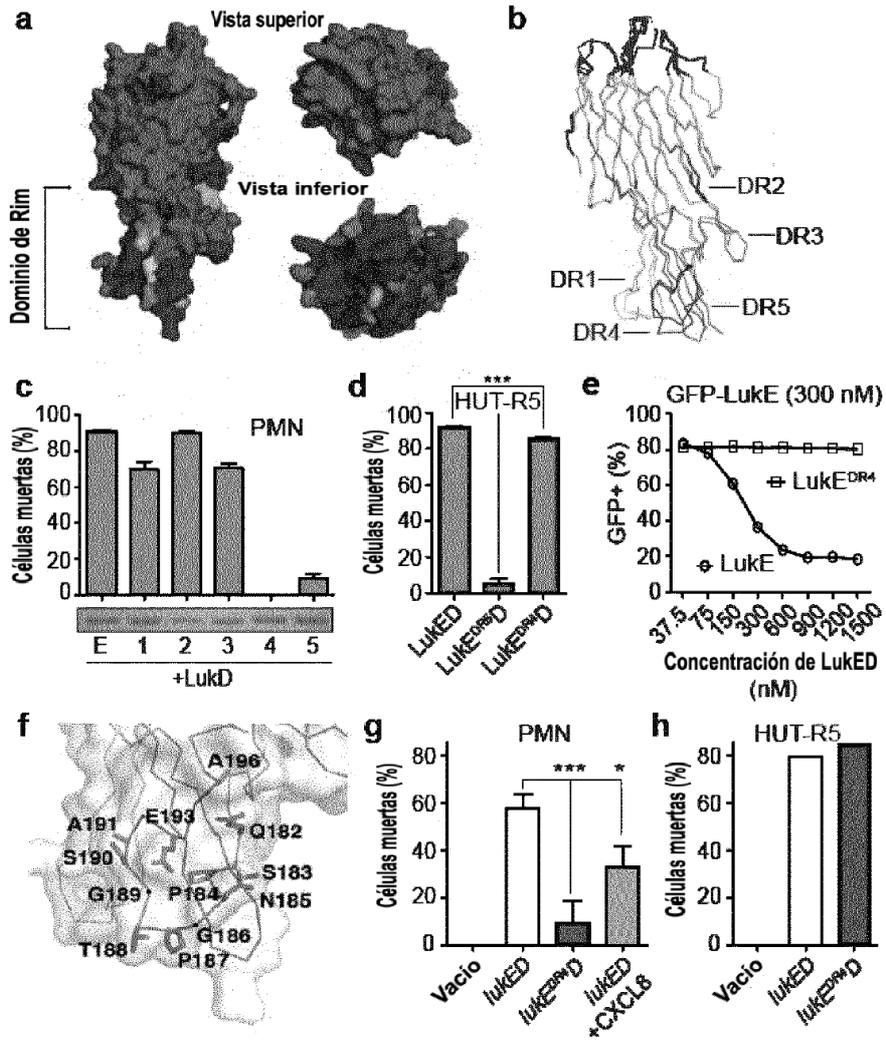


Figura 8



Figuras 9A-9H

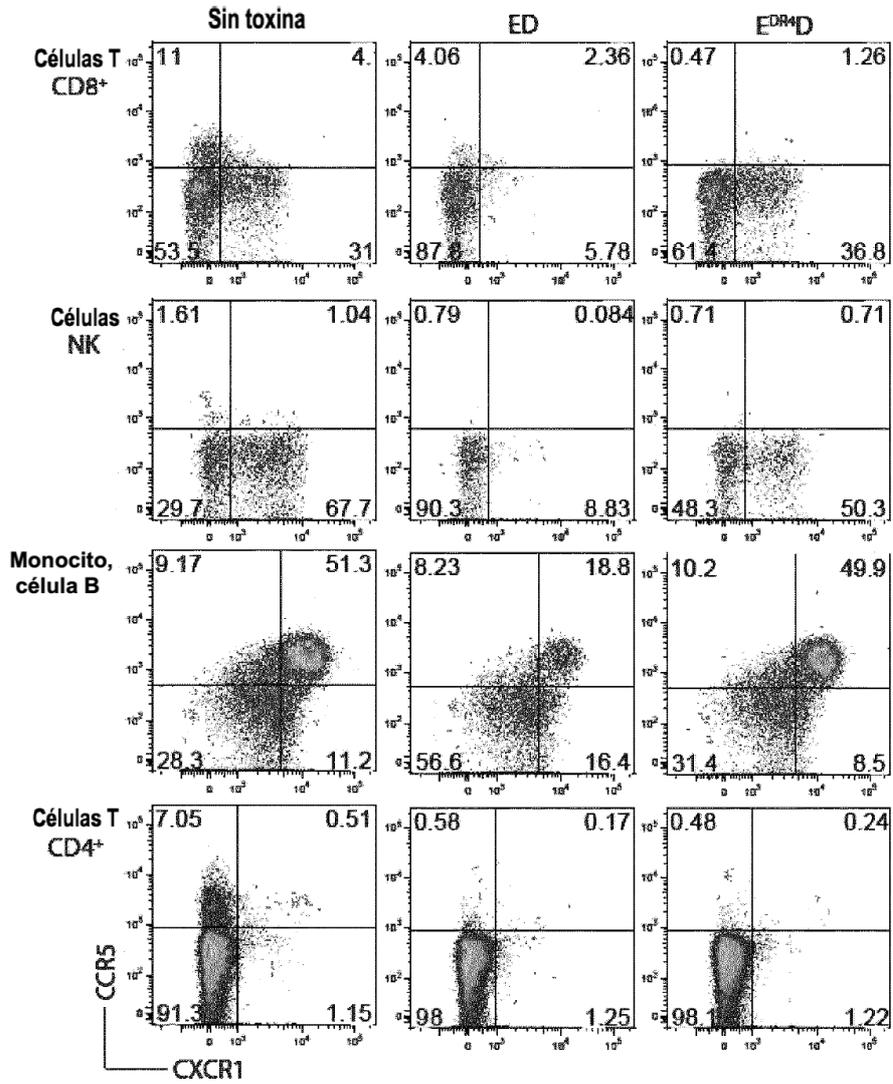
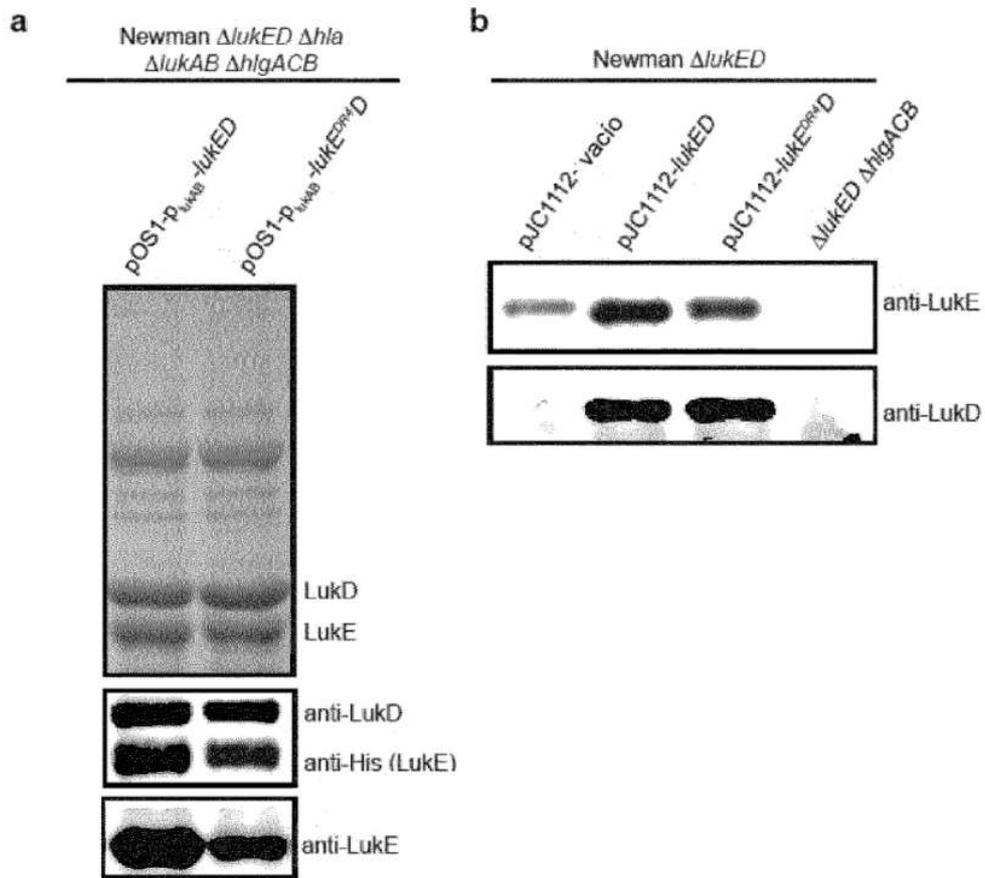
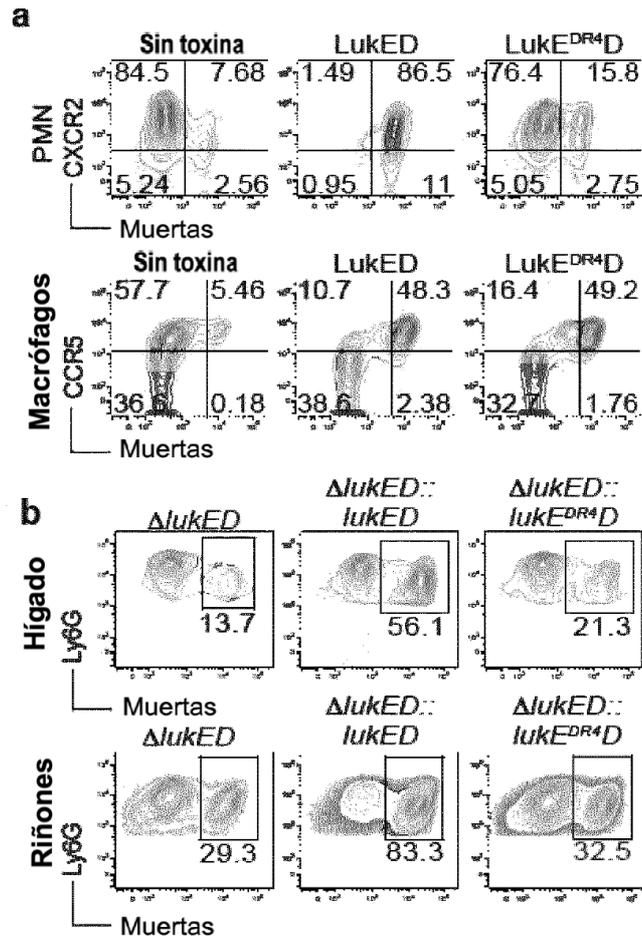


Figura 10



Figuras 11A-11B



Figuras 12A-12B

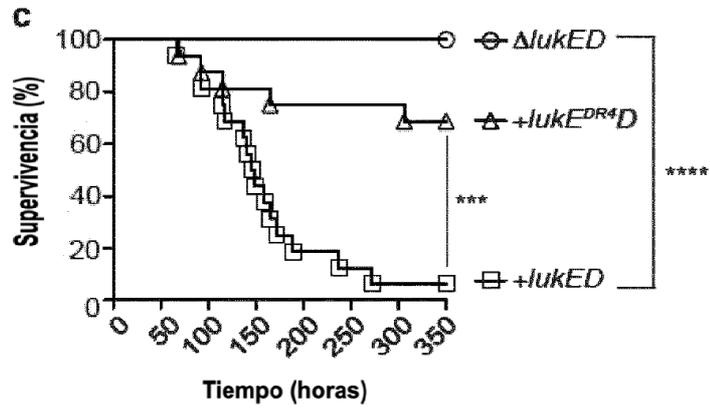
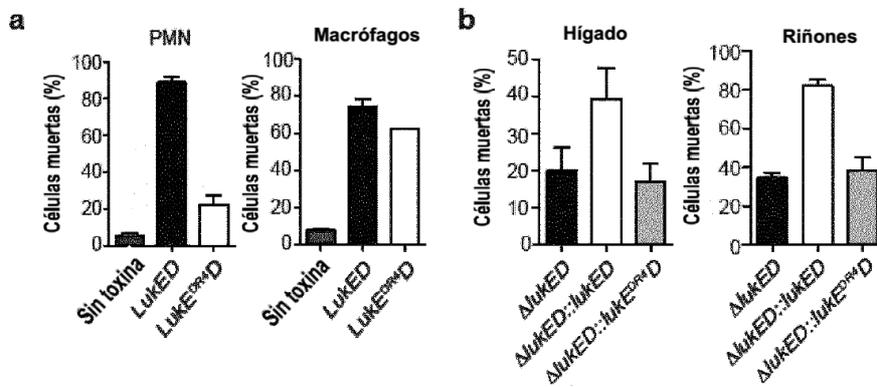


Figura 12C



Figuras 13A-13B

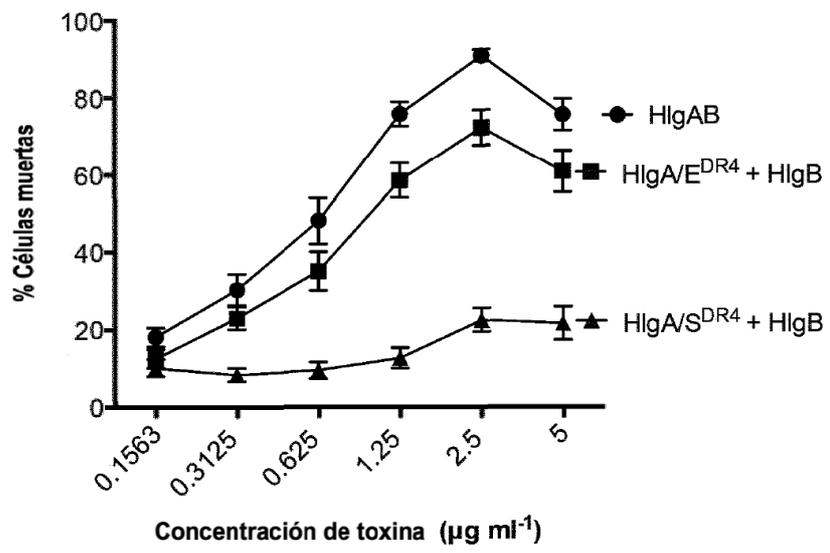
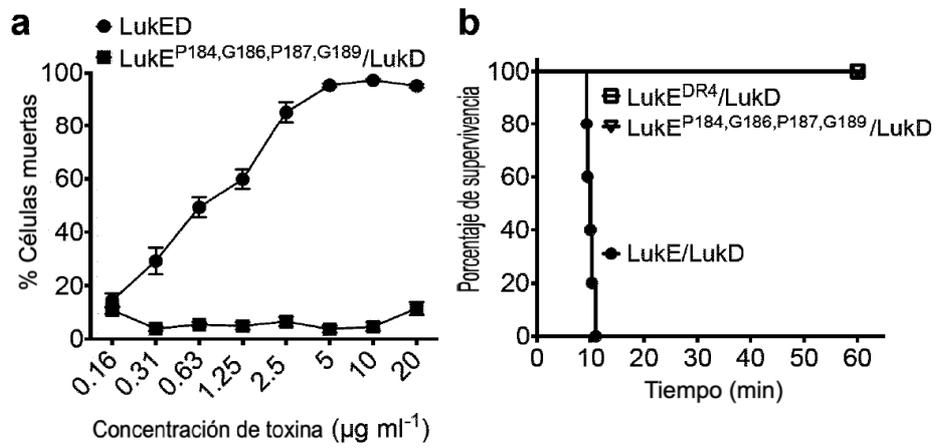
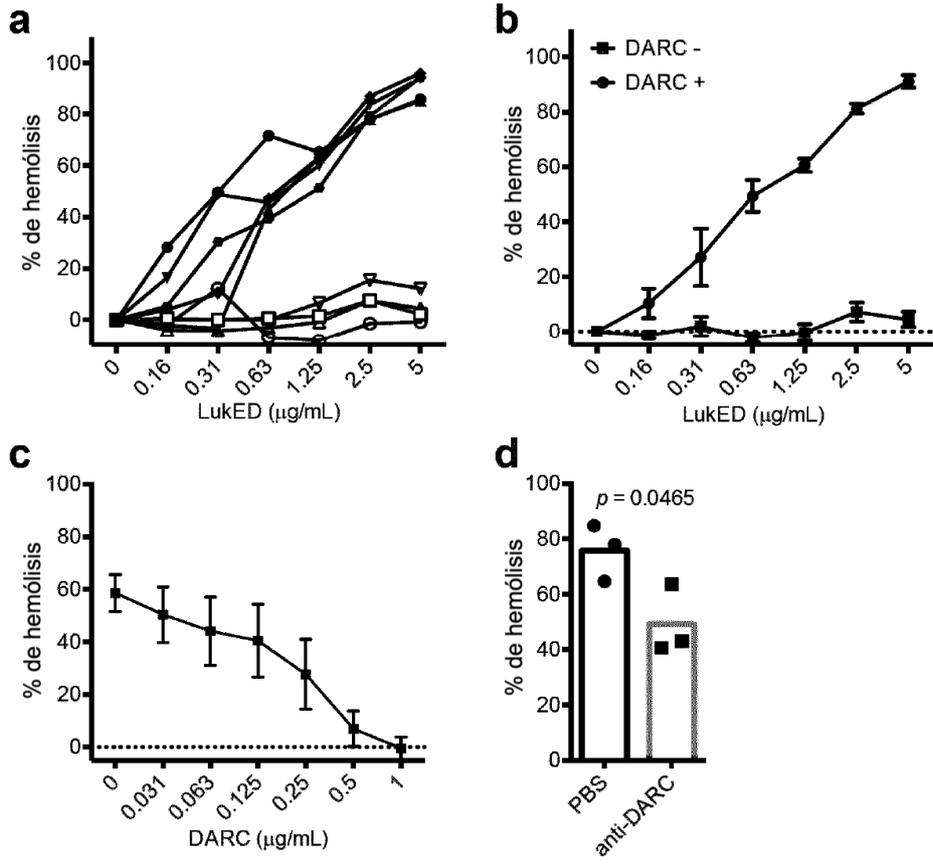


Figura 14



Figuras 15A-15B



Figuras 16A-16D