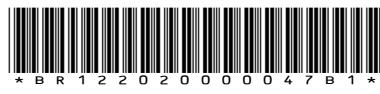




República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122020000047-3 B1



(22) Data do Depósito: 19/06/2012

(45) Data de Concessão: 13/04/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO PROTEÍNA LUKE ISOLADA OU POLIPEPTÍDEO DA MESMA, UMA PROTEÍNA LUKD ISOLADA OU POLIPEPTÍDEO DA MESMA OU SUA COMBINAÇÃO, BEM COMO SEU USO

(51) Int.Cl.: A61K 39/085; A61K 39/395.

(30) Prioridade Unionista: 19/06/2011 US 61/498,596.

(73) Titular(es): NEW YORK UNIVERSITY.

(72) Inventor(es): VICTOR J. TORRES; FRANCIS ALONZO.

(86) Pedido PCT: PCT US2012043179 de 19/06/2012

(87) Publicação PCT: WO 2012/177658 de 27/12/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/01/2020

(62) Pedido Original do Dividido: BR112013032774-0 - 19/06/2012

(57) Resumo: A presente invenção se refere a métodos e composições para prevenir e tratar *Staphylococcus aureus* em um sujeito. Composições terapêuticas da presente invenção compreendem proteínas ou polipeptídeos de leucocidina E e/ou D e anticorpos antileucocidina E/ou D. A invenção ainda se refere a métodos para identificar inibidores de citotoxicidade de LukE/D e inibidores de ligação de LukE/D-leucócito.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO PROTEÍNA LUKE ISOLADA OU POLIPEPTÍDEO DA MESMA, UMA PROTEÍNA LUKD ISOLADA OU POLIPEPTÍDEO DA MESMA OU SUA COMBINAÇÃO, BEM COMO SEU USO".

Dividido do BR112013032774-0, depositado em 19.06.2012.

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório US 61/498.596, depositado em 19 de junho de 2011, que está aqui incorporado por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[0002] Esta invenção refere-se aos métodos de triagem para tratar e infecções por *Staphylococcus aureus* e condições associadas a *Staphylococcus aureus*.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0003] *Staphylococcus aureus* ("S. aureus") é uma bactéria que comensalmente coloniza mais do que 25% da população humana. De modo importante, este organismo é capaz de quebrar seu local inicial de colonização, resultando em disseminação e doença bacteriana. S. aureus é a principal causa de infecções nosocomiais, é o agente etiológico mais comum de endocardite infecciosa bem como infecções de pele e tecido mole, e é uma das quatro causas principais de doenças de origem alimentar. Juntas, S. aureus infecta mais do que 1,2 milhão de pacientes por ano em hospitais dos EUA. A ameaça de S. aureus à saúde humana é ainda destacada pela emergência das cepas resistentes a antibióticos (ou seja, cepas de S. aureus resistentes a meticilina (MRSA)), incluindo cepas que são resistentes a vancomicina, um antibiótico considerado de última linha de defesa contra infecção por S. aureus. Estes fatos destacam a importância do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra este patógeno importante.

[0004] S. aureus produz um arranjo diverso de fatores de virulên-

cia e toxinas que permitem que esta bactéria neutralize e resiste ao ataque por diferentes tipos de células imunes, especificamente subpopulações de células brancas sanguíneas que compõem o sistema de defesa primário corporal. A produção destes fatores de virulência e toxinas permite que *S. aureus* mantenha um estado infeccioso (ver Nizet, "Understanding How Leading Bacterial Pathogens Subvert Innate Immunity to Reveal Novel Therapeutic Targets," *J. Allergy Clin. Immunol.* 120(1):13-22 (2007)). Entre estes fatores de virulência, *S. aureus* produz várias leucotoxinas bicomponentes, que danificam as membranas de células de defesa do hospedeiro e eritrócitos pela ação sinérgica de duas proteínas não associadas ou subunidades (ver, Menestrina et al., "Mode of Action of Beta-Barrel Pore-Forming Toxins of the Staphylococcal Alpha-Hemolysin Family," *Toxicol.* 39(11):1661-1672 (2001)). Entre estas leucotoxinas bicomponentes, gama-hemolisina (HlgAB e HlgCB) e Leucocidina de Pantone-Valentine (PVL) são mais bem caracterizadas.

[0005] A toxicidade de leucocidinas para células mamíferas envolve a ação de dois componentes ou subunidades. A primeira subunidade é chamada de subunidade classe S (ou seja, "eluída lenta"), e a segunda subunidade é chamada de subunidade classe F (ou seja, "eluída rápida"). As subunidades S e F atuam sinergicamente para formar poros em células brancas sanguíneas incluindo monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (coletivamente conhecidos como fagócitos) (ver Menestrina et al., "Mode of Action of Beta-Barrel Pore-Forming Toxins of the Staphylococcal Alpha-Hemolysin Family," *Toxicol.* 39(11):1661-1672 (2001)). O mecanismo pelo qual as toxinas bicomponentes formam poros em membranas de células alvo não é totalmente entendido. O mecanismo de ação proposto destas toxinas envolve a ligação da subunidade S à membrana de célula alvo, mais provavelmente através de um receptor, seguido por ligação da subuni-

dade F à subunidade S, assim, formando um oligômero que por sua vez forma um pré-poro que insere na membrana de célula alvo (Jaysinghe et al., "The Leukocidin Pore: Evidence for an Octamer With Four LukF Subunits and Four LukS Subunits Alternating Around a Central Axis," *Protein. Sci.* 14(10):2550-2561 (2005)). Os poros formados pelas leucotoxinas bicomponentes são tipicamente seletivos para cátion. A formação de poro causa morte celular via lise, que no caso de células brancas sanguíneas alvo, foi reportado resultar de um desequilíbrio osmótico devido ao influxo de cátions (Miles et al., "The Staphylococcal Leukocidin Bicomponent Toxin Forms Large Ionic Channels," *Biochemistry* 40(29):8514-8522 (2001)).

[0006] Além de PVL (também conhecido como leucocidina S/F-PV ou LukSF-PV) e gama-hemolisina (HlgAB e HlgCB), o repertório de leucotoxinas bicomponentes produzido pro *S. aureus* é conhecido por incluir leucocidina E/D ("LukE/D"), leucocidina A/B ("LukAB") e leucocidina M/F ("LukMF"). Assim, as subunidades de classe S destes leucocidinas bicomponentes incluem HlgA, HlgC, LukE, LukS-PV, LukA, e LukM, e as subunidades classe F incluem HlgB, LukD, LukF-PV, LukB, e LukF'-PV. As subunidades S e F de *S. aureus* não são específicos de leucocidina. Ou seja, são intercambiáveis de modo que as combinações bicomponentes poderiam gerar um poro funcional em uma célula branca do sangue, enormemente aumentando o repertório de leucotoxinas (Meyer et al., "Analysis of the Specificity of Panton-Valentine Leucocidin and Gamma-Hemolysin F Component Binding," *Infect. Immun.* 77(1):266-273 (2009)).

[0007] Desenhar uma terapia efetiva para tratar infecção por MRSA foi especialmente desafiador. Além da resistência à meticilina e antibióticos relacionados, MRSA ainda demonstrou ter níveis significativos de resistência aos macrolídeos (por exemplo, eritromicina), combinações de inibidor de beta-lactamase (por exemplo, Unasyn, Aug-

mentin), e fluorquinolonas (por exemplo, ciprofloxacina), bem como clindamicina, trimetoprima/sulfametoxasol (Bactrim), e rifampina. No caso de infecção grave por *S. aureus*, os médicos recorrem à vancomicina intravenosa. No entanto, há relatos de resistência de *S. aureus* à vancomicina. Assim, há uma necessidade para desenvolver novos tratamentos que efetivamente combatem infecção por *S. aureus*.

[0008] A presente invenção é direcionada para superar estas e outras limitações na técnica.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0009] Um primeiro aspecto da presente invenção refere-se a uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína Leucocidina E (LukE) isolada ou polipeptídeo da mesma, uma proteína Leucocidina D (LukD) isolada ou polipeptídeo da mesma, ou uma combinação das mesmas, e um carreador farmaceuticamente aceitável.

[0010] Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para imunizar contra uma infecção por *Staphylococcus aureus* em um sujeito. Este método envolve administrar uma composição da presente invenção em uma quantidade efetiva para imunizar contra infecção por *S. aureus* no sujeito.

[0011] Outro aspecto da presente invenção refere-se a uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo selecionado do grupo que consiste em um anticorpo LukE, um anticorpo LukD, ou uma combinação dos mesmos, em um carreador farmaceuticamente aceitável.

[0012] Outro aspecto da presente invenção é dirigido a um método para prevenir uma infecção por *S. aureus* e/ou condições associadas à *S. aureus* em um sujeito. Este método envolve administrar uma composição compreendendo um anticorpo selecionado do grupo que consiste em um anticorpo LukE, um anticorpo LukD, ou uma combinação

dos mesmos, em uma quantidade efetiva para prevenir infecção por *S. aureus* e/ou condição associada à *S. aureus* no sujeito.

[0013] Outro aspecto da presente invenção é direcionado a um método para tratar uma infecção por *S. aureus* e/ou condições associadas à *S. aureus* em um sujeito. Este método envolve administrar uma composição compreendendo um ou mais inibidores de citotoxicidade mediada por LukE/D em uma quantidade efetiva para tratar a infecção por *S. aureus* e/ou a condição associada à *S. aureus* no sujeito.

[0014] Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para prever a gravidade de infecção por *S. aureus*. Este método envolve cultivar *S. aureus* obtida de um sujeito infectado via uma amostra de fluido ou tecido a partir do sujeito e quantificar a expressão de LukE e/ou LukD no *S. aureus* cultivado. As quantidades quantificadas de LukE e/ou LukD na amostra do sujeito são comparadas à quantidade de LukE e/ou LukD em uma amostra controle que produz pouca ou quantidades indetectáveis de LukE e/ou LukD e a gravidade da infecção por *S. aureus* é prevista baseado em dita comparação.

[0015] Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para tratar um sujeito com infecção por *S. aureus*. Este método envolve cultivar *S. aureus* obtido de um sujeito infectado via uma amostra de fluido ou tecido do sujeito e quantificar a expressão de LukE e/ou LukD no *S. aureus* cultivado. As quantidades quantificadas de LukE e/ou LukD na amostra do sujeito são comparadas à quantidade de LukE e/ou LukD em uma amostra controle que produz pouca ou quantidades indetectáveis de LukE e/ou LukD e um tratamento apropriado para o sujeito é determinada baseado nesta comparação. O método ainda envolve administrar o tratamento apropriado determinado ao sujeito para tratar a infecção por *S. aureus*.

[0016] Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para identificar inibidores de citotoxicidade de LukE/D. Este método

envolve fornecer uma população de células, uma preparação contendo LukE/D, e um inibidor de LukE/D candidato. A população de célula é exposta à preparação contendo LukE/D na presença e ausência do inibidor candidato, e citotoxicidade mediada por LukE/D é medida na presença e na ausência do inibidor candidato. A quantidade medida de citotoxicidade na presença e na ausência do inibidor candidato é comparada e um inibidor de citotoxicidade de LukE/D é identificada baseado naquela comparação.

[0017] Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para identificar inibidores de formação de poro mediada por LukE/D. Este método envolve fornecer uma população de leucócitos, uma preparação contendo LukE e LukD, e um inibidor candidato. A população de leucócito é exposta à preparação contendo LukE e LukD na presença e ausência do inibidor candidato, e a formação do poro na população de leucócito é medida na presença e ausência do inibidor candidato. A quantidade medida de formação de poro na presença e na ausência do inibidor candidato é comparada e um inibidor de formação de poro mediada por LukE/D é identificada baseado naquela comparação.

[0018] Outro aspecto da presente invenção é direcionado à um método para identificar inibidores de ligação de leucócito LukE e/ou LukD. Este método envolve fornecer uma população de leucócitos, uma preparação contendo LukE e LukD marcadamente detectável, e um inibidor candidato. A população de célula é exposta à preparação contendo o LukE e LukD detectavelmente marcado na presença e ausência do inibidor candidato, e ligação de LukE e/ou LukD marcado à população de leucócito é medida na presença e ausência do inibidor candidato. A quantidade medida de leucócito de ligação de LukE e/ou LukD na presença e na ausência do inibidor candidato é comparada e um inibidor de ligação de leucócito de LukE e/ou LukD é identificado

baseado nesta comparação.

[0019] O sucesso tremendo de *S. aureus* como um patógeno é em parte devido à sua capacidade de expressar um arsenal de fatores que danificam o hospedeiro. Entre estes fatores estão um número de toxinas de proteína bacteriana que são secretadas no meio extracelular onde atuam matando células hospedeiras. Leucocidina E/D (LukE/D) é uma toxina fracamente caracterizada produzida por *S. aureus*. Como demonstrado aqui, esta toxina se direciona e mata leucócitos hospedeiros, que são células imunes importantes na proteção do hospedeiro de infecção por *S. aureus*. O achado que LukE/D é crítica para a patogênese *in vivo*, destaca a importância desta toxina no processo de doença. Como descrito aqui, a imunização com LukE e/ou LukD gera anticorpos neutralizantes contra *S. aureus*. Portanto, estratégias de vacina ativa e/ou passiva oferece uma nova estratégia terapêutica para prevenir infecção por *S. aureus*. Além disso, a inibição direta de citotoxicidade mediada por LukE/D oferece um novo meio para tratar indivíduos com infecção por *S. aureus*.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0020] As Figuras 1A-1B mostram que a deleção do gene *rot* em *S. aureus* desprovido de locus *agr* ($\Delta\text{agr}\Delta\text{rot}$) restaura a virulência em camundongos aos níveis de tipo selvagem ("WT") e leva à super produção de LukE/D. Figura 1A é uma curva de sobrevivência que mostra que um mutante duplo $\Delta\text{agr} \Delta\text{rot}$ apresenta características de virulência WT em camundongos. A sobrevivência de camundongos foi monitorada após injeção intravenosa com $\sim 1 \times 10^7$ CFU de *S. aureus* WT, Δagr , ou mutantes duplos $\Delta\text{agr} \Delta\text{rot}$. Número total de camundongos por grupo foi de N=6. A significância estatística entre curvas foi determinada usando o teste Log-rank (Mantel-Cox). ***, p $\leq 0,0005$. Na Figura 1B, a produção de leucotoxinas é restabelecida em um mutante duplo $\Delta\text{agr} \Delta\text{rot}$. São mostrados immunoblots de amostras de proteína de so-

brenadantes de cultura bacteriana precipitada por TCA (crescida por 5 horas em RPMI+CAS) das seguintes cepas: WT, Δ agr, e Δ agr Δ rot. Pistas de controle negativo contêm sobrenadante precipitado por TCA de respectivas mutantes de deleção de leucotoxina (Δ lukE/D, Δ lukA/B, Δ hla, Δ hlgC). Exoproteínas mutantes duplas Δ lukE/D Δ hlgACB foram ainda sondados em todos os LukE immunoblots como um controle para reatividade cruzada de anticorpo LukE.

[0021] As Figuras 2A-2C ilustram que a deleção de *rot* isolado resulta em hipervirulência em animais, um fenótipo causado por depressão e superprodução resultante de LukE/D. A curva de sobrevida de Figura 2A mostra a hipervirulência de um mutante Δ rot comparado com uma cepa WT parental. A sobrevida de camundongos foi monitorada após injeção intravenosa com $\sim 1 \times 10^7$ CFU de *S. aureus* cepas WT e Δ rot. Número total de camundongos por grupo: WT, N=17; Δ rot, N=12. A produção de LukE/D é aumentada na ausência do repressor de transcrição Rot, enquanto a produção de outras leucotoxinas é amplamente não afetada. São mostrados nos immunoblots da Figura 2B amostras de proteínas de sobrenadantes de cultura bacteriana precipitada em TCA (crescidos por 5 horas em RPMI+CAS) das seguintes cepas: WT, e Δ rot. Pistas de controle negativo contêm sobrenadante precipitado com TCA dos respectivos mutantes duplos toxina-rot (Δ rot Δ lukE/D, Δ rot Δ lukA/B, Δ rot Δ hla, e Δ rot Δ hlgACB). Exoproteínas de mutantes triplas Δ rot Δ lukE/D Δ hlgACB foram ainda sondadas em todos os LukE immunoblots como um controle para reatividade cruzada de anticorpo LukE. Como indicado pela curva de sobrevivência da Figura 2C, a hipervirulência de um mutante Δ rot é derivada à produção aumentada de LukE/D. A sobrevida de camundongos foi monitorada após injeção intravenosa com $\sim 1 \times 10^7$ CFU de *S. aureus* WT, Δ rot, e Δ rot Δ lukE/D. A significância estatística entre curvas de sobrevivência foi determinada usando o teste Log-rank (Mantel-Cox). **, p \leq 0,005;

***, $p \leq 0,0005$.

[0022] As Figuras 3A-3B mostram que Rot se liga ao promotor *lukE/D* e reprime a expressão do gene. Como mostrado na Figura 3A, expressão de gene ideal *lukE/D* é dependente de desrepressão de Rot. As fusões de transcrição de região promotora *lukE/D* para GFP foram usadas para medir a ativação do promotor em caldo de cultura nos seguintes fundamentos de cepa (WT, Δagr , Δrot , e $\Delta agr \Delta rot$). Fluorescência GFP foi medida ao longo do tempo e os valores expressos como unidades fluorescentes relativas (RFU) após normalização à densidade óptica bacteriana a 600nm. Os valores mostrados são resultados de três experimentos realizados em triplicata. Na Figura 3B, Rot se liga ao promotor *lukE/D*. A Figura 3B é um immunoblot de um promotor pull-down de DNA intragênico biotinilado (não específico) ou DNA promotor de *lukE/D* ligado às esferas magnéticas de estreptavidina M280 e incubados com lisados de células inteiras de *S. aureus*. Rot foi detectado via immunoblot usando um anticorpo anti-Rot.

[0023] As Figuras 4A-4F ilustram que um mutante simples $\Delta lukE/D$ é significativamente atenuado para virulência em um modelo de camundongo de infecção sistêmica. As Figuras 4A e 4B mostram a verificação da deleção *lukE/D* em *S. aureus* Newman. Na Figura 4A, PCR de DNA genômico de *S. aureus* com iniciadores específicos de *lukE* é mostrado. São mostrados na Figura 4B immunoblots de amostras de proteínas de sobrenadantes de cultura bacteriana precipitada com TCA (crescidas por 5 horas em RPMI+CAS) das seguintes cepas: WT, $\Delta lukE/D$, $\Delta lukE/D::plukE/D$, $\Delta hlgACB$, e $\Delta hlgACB$. Exoproteínas mutantes $\Delta lukE/D$ foram ainda sondadas como um controle para reatividade cruzada de anticorpo LukE. Figuras 4C-4F mostram que o mutante $\Delta lukE/D$ é gravemente comprometido para virulência em camundongos. Nas Figuras 4C e 4D, a sobrevida de camundongos foi monitorada após injeção intravenosa com $\sim 1 \times 10^7$ CFU (Figura 4C) ou $\sim 1 \times 10^8$ CFU (Figura 4D).

ra 4D) de *S. aureus* cepas WT, $\Delta luke/D$, and $\Delta luke/D::pluke/D$. Número total de camundongos por grupo foi de N=6. A significância estatística entre curvas foi determinada usando o teste Log-rank (Mantel-Cox). **, p ≤ 0,005; ***, p ≤ 0,0005. As Figuras 4E e 4F descrevem enumeração de CFU bacteriano (Figura 4E) patologia bruta (Figura 4F) de rins 96 horas após a infecção com $\sim 1 \times 10^7$ CFU das mesmas cepas descritas para as Figuras 4C e 4D. As setas designam locais de abscessos renais. A significância estatística foi determinada usando ANOVA de uma via com várias comparações pós-testes de Tukey. **, p ≤ 0,005; ***, p ≤ 0,0005.

[0024] As Figuras 5A-5E mostram que LukE/D é tóxica para e forma poros em células imunes humanas. A Figura 5A é uma curva de viabilidade celular que mostra que LukE/D recombinante purificado é tóxico à linhagem celular tipo monócito humana THP-1. A linhagem celular THP-1 foi intoxicada com LukE, LukD recombinante, ou uma mistura de LukE+LukD (LukE/D). A viabilidade celular foi monitorada 1 hora após a intoxicação usando CellTiter, onde as células tratadas com meio foram ajustadas para 100% viáveis. Os resultados representam a média de amostras em triplicata \pm S.D. LukE/D recombinante purificada é não tóxica à linhagem celular HL60 humana, como mostrado na curva de viabilidade celular da Figura 5B. A linhagem celular HL60 foi intoxicada como acima e a viabilidade celular foi monitorada 1 hora após a intoxicação usando CellTiter, onde as células tratadas com meio foram ajustadas em 100% viáveis. Em contraste, as curvas de viabilidade celular da Figura 5C mostram LukE/D recombinante purificada é tóxica a ambos neutrófilos primários humanos (gráfico da esquerda) e murinos primárias (gráfico da direita) (também conhecidos como neutrófilos polimorfonucleares ou PMNs). Os PMNs foram intoxicados como acima e a viabilidade celular foi monitorada 1 hora após a intoxicação usando CellTiter, onde as células tratadas com meio foram

ajustadas em 100% viáveis. LukE/D medeia a citotoxicidade para células hospedeiras THP-1 formando poros na membrana celular como mostrado na Figura 5D. As células THP-1 e HL60 foram incubadas com LukE/D purificada, e a formação de poro foi medida com um ensaio de incorporação de brometo de etídio. A fluorescência média de experimentos em triplicata é mostrada para ambos THP-1 e HL60. Figura 5E mostra uma imagem de microscopia de absorção de brometo de etídio de LukE/D tratada (30 µg/ml) e células controle (sem toxina) de THP-1.

[0025] As Figuras 6A-6B ilustram que a citotoxicidade de LukE/D é neutralizada com uma afinidade purificada de anticorpo policlonal α-LukE. As células THP-1 foram intoxicadas com 1,5 µg de LukE/D recombinante após incubação com 0,1 µg de anticorpo policlonal α-LukE ou soro pré-imune. A viabilidade celular (Figura 6A) e formação de poro (Figura 6B) foram monitorados usando CellTiter e brometo de etídio respectivamente. Para os ensaios de CellTiter, as células tratadas com meio foram ajustadas para 100% de viabilidade. Os resultados representam a média de amostras em duplicata \pm desvio padrão (S.D.).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0026] Um primeiro aspecto da presente invenção refere-se a uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma proteína LukE isolada ou polipeptídeo da mesma, uma proteína LukD isolada ou polipeptídeo da mesma, ou uma combinação das mesmas, em um carreador farmaceuticamente aceitável.

[0027] Em uma modalidade da invenção, a composição compreende uma proteína LukE isolada ou polipeptídeo. Em outra modalidade da invenção, a composição compreende uma proteína LukD isolada ou polipeptídeo. Ainda em outra modalidade da invenção a composição compreende ambas as proteínas LukE e LukD ou polipeptídeos.

[0028] De acordo com este aspecto da invenção, proteínas LukE

isoladas apropriadas incluem aquelas derivadas de qualquer cepa de *S. aureus*. A sequência de aminoácido de proteínas LukE de várias cepas de *S. aureus* que são apropriadas para a composição da presente invenção são mostradas na Tabela 1 abaixo (*ou seja*, SEQ ID Nos:1-10). SEQ ID NO:11 da Tabela 1 é uma sequência consenso LukE demonstrando o alto nível de identidade de sequência através das proteínas LukE de várias cepas *S. aureus*. Assim, em uma modalidade da presente invenção, a proteína LukE isolada compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO:11. Em outra modalidade da presente invenção, a proteína LukE isolada compreende uma sequência de aminoácido contendo cerca de 70-80% similaridade de sequência a SEQ ID NO:11, mais preferencialmente, cerca de 80-90% similaridade de sequência à SEQ ID NO:11, e mais preferencialmente 90-95% similaridade de sequência à SEQ ID NO:11, e mais preferencialmente cerca de 95-99% similaridade de sequência à SEQ ID NO:11.

[0029] Em outra modalidade da presente invenção, a composição compreende um polipeptídeo imunogênico isolado de LukE. Polipeptídeos LukE apropriados são cerca de 50 a cerca de 100 aminoácidos em comprimento. Mais preferencialmente polipeptídeos LukE são entre cerca de 100-200 aminoácidos em comprimento, mais preferencialmente entre cerca de 200-250 aminoácidos em comprimento, e mais preferencialmente entre 250-300 aminoácidos em comprimento. Os resíduos de aminoácido N-terminal de LukE completa representam a sequência de secreção nativa/sinal. Assim, a forma "madura" secretada de LukE é representada por resíduos de aminoácido 29-311 em cada uma das SEQ ID NOs:1-10 e SEQ ID NO:11. Correspondentemente, resíduos de aminoácido 1-311 em cada uma das SEQ ID NOs:1-10 e SEQ ID NO:11 são referenciados como a forma "imatura" de LukE. Assim, em uma modalidade da presente invenção, os poli-

peptídeos LukE compreendem resíduos de aminoácidos 29-311 da SEQ ID NO:11. Alternativamente, o polipeptídeo LukE da presente invenção compreende resíduos de aminoácidos 48-291, aminoácidos 29-301, ou aminoácidos 48-301 de SEQ ID NO:11. Estes polipeptídeos LukE são desprovidos de atividade de LukE, mas mantendo a antigenicidade. Nestes casos, polipeptídeos LukE apropriados ainda incluem aqueles polipeptídeos compreendendo uma sequência de aminoácido contendo cerca de 70-80% similaridade de sequência, preferencialmente 80-90% similaridade de sequência, mais preferencialmente 90-95% similaridade de sequência, e mais preferencialmente 95-99% similaridade de sequência aos resíduos de aminoácidos 29-311 da SEQ ID NO:11, resíduos de aminoácidos 48-291 da SEQ ID NO:11, resíduos de aminoácidos 29-301 da SEQ ID NO:11, ou resíduos de aminoácidos 48-301 da SEQ ID NO:11.

[0030] De acordo com este aspecto da invenção, proteínas LukD isoladas apropriadas incluem aquelas proteínas derivadas de qualquer cepa de *S. aureus*. A sequência de aminoácido de proteínas LukD de várias cepas de *S. aureus* que são apropriadas para a composição da presente invenção são mostradas na Tabela 2 abaixo (*ou seja*, SEQ ID Nos: 12-21). SEQ ID NO:22 da Tabela 2 é uma sequência consenso LukD demonstrando o alto nível de identidade de sequência através das proteínas LukD de várias cepas *S. aureus*. Assim, em uma modalidade da presente invenção, a proteína LukD isolada compreende uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO:22. Em outra modalidade da presente invenção, a proteína LukD isolada compreende uma sequência de aminoácido contendo cerca de 70-80% similaridade de sequência à SEQ ID NO:22, preferencialmente, cerca de 80-90% similaridade de sequência à SEQ ID NO:22, e mais preferencialmente 90-95% similaridade de sequência à SEQ ID NO:22, e mais preferencialmente cerca de 95-99% similaridade de sequência à SEQ ID NO:22.

[0031] Em outra modalidade da presente invenção, a composição compreende um polipeptídeo imunogênico de LukD. Polipeptídeos LukD apropriados são cerca de 50 a cerca de 100 aminoácidos em comprimento. Mais preferencialmente polipeptídeos LukD são entre cerca de 100-200 aminoácidos em comprimento, mais preferencialmente entre cerca de 200-250 aminoácidos em comprimento, e mais preferencialmente entre 250-300 aminoácidos em comprimento. Os resíduos de aminoácidos N-terminal de LukD completa representam a sequência de secreção nativa/sinal. Assim, a forma madura secretada de LukD é representada por resíduos de aminoácidos 27-327 em cada uma das SEQ ID NOs:12-21 e SEQ ID NO:22. Assim, resíduos de aminoácidos 1-327 da SEQ ID NOs:12-21 e SEQ ID NO:22 são referenciadas como a forma "imatura" de LukD. Assim, em uma modalidade da presente invenção, o polipeptídeo LukE compreende resíduos de aminoácidos 27-327 da SEQ ID NO:22. Alternativamente, o polipeptídeo LukE da presente invenção compreende resíduos de aminoácidos 46-307, 27-312, e 46-312 da SEQ ID NO:22. Este polipeptídeo LukD é desprovido de atividade de LukD, mas mantém antigenicidade. Em cada um dos casos, polipeptídeos apropriados ainda incluem aqueles polipeptídeos compreendendo uma sequência de aminoácido contendo cerca de 70-80% similaridade de sequência, preferencialmente 80-90% similaridade de sequência, mais preferencialmente 90-95% similaridade de sequência, e mais preferencialmente 95-99% similaridade de sequência aos resíduos de aminoácidos 27-327 da SEQ ID NO:22, resíduos de aminoácidos 46-307 da SEQ ID NO:22, resíduos de aminoácidos 27-312 da SEQ ID NO:22, ou resíduos de aminoácidos 46-312 da SEQ ID NO:22.

Tabela 1 - Alinhamento de sequência LukE de *S. Aureus*

Cepa de <i>S. Aureus</i>	
Newman	MFEKKMLAATLSVGLIAPLASPIQEGRANTNIENICDCAEVIRKTEDVSS 50
MW2	SEQ ID NO:1
USA_300_FPR3757	MFEKKMLAATLSVGLIAPLASPIQEGRANTNIENIGDGAEVIRKTEDVSS 50
COL	SEQ ID NO:2
USA_300_TCH1516	MFEKKMLAATLSVGLIAPLASPIQEGRANTNIENICDCAEVIRKTEDVSS 50
N315	SEQ ID NO:3
D30	MFEKKMLAATLSVGLIAPLASPIQEGRANTNIENIGDGAEVIRKTEDVSS 50
M250	SEQ ID NO:4
TCH_70	MFEKKMLAATLSVGLIAPLASPIQEGRANTNIENIGDGAEVIRKTEDVSS 50
MRSAl31	SEQ ID NO:5
Sequência consenso LukE	MFEKKMLAATLSVGLIAPLASPIQEGRANTNIENICDCAEVIRKTEDVSS 50 SEQ ID NO:6
Newman	MFEKKMLAATLSVGLIAPLASPIQEGRANTNIENIGDGAEVIRKTEDVSS 50
MW2	SEQ ID NO:7
USA_300_FPR3757	MFEKKMLAATLSVGLIAPLASPIQEGRANTNIENIGDGAEVIRKTEDVSS 50
COL	SEQ ID NO:8
USA_300_TCH1516	MFEKKMLAATLSVGLIAPLASPIQEGRANTNIENIGDGAEVIRKTEDVSS 50
N315	SEQ ID NO:9
D30	MFEKKMLAATLSVGLIAPLASPIQEGRANTNIENIGDGAEVIRKTEDVSS 50
M250	SEQ ID NO:10
TCH_70	MFEKKMLAATLSVGLIAPLASPIQEGRANTNIENIGDGAEVIRKTEDVSS 50
MRSAl31	SEQ ID NO:11
Sequência consenso LukE	MFEKKMLAATLSVGLIAPLASPIQEGRANTNIENICDCAEVIRKTEDVSS 50 SEQ ID NO:11
Newman	KKGAVTQNVQFDPVKDKKYNKDALIVRMQGFINSRTSFSDVCGSGYELIK 100
MW2	KKGAVTQNVQFDPVKDKKYNKDALIVRMQGFINSRTSFSDVCGSGYELIK 100
USA_300_FPR3757	KKGAVTQNVQFDPVKDKKYNKDALIVRMQGFINSRTSFSDVCGSGYELIK 100
COL	KKGAVTQNVQFDPVKDKKYNKDALIVRMQGFINSRTSFSDVCGSGYELIK 100
USA_300_TCH1516	KKGAVTQNVQFDPVKDKKYNKDALIVRMQGFINSRTSFSDVCGSGYELIK 100
N315	KKGAVTQNVQFDPVKDKKYNKDALIVRMQGFINSRTSFSDVCGSGYELIK 100
D30	KKGAVTQNVQFDPVKDKKYNKDALIVRMQGFINSRTSFSDVCGSGYELIK 100
M250	KKGAVTQNVQFDPVKDKKYNKDALIVRMQGFINSRTSFSDVCGSGYELIK 100
TCH_70	KKGAVTQNVQFDPVKDKKYNKDALIVRMQGFINSRTSFSDVCGSGYELIK 100
MRSAl31	KKGAVTQNVQFDPVKDKKYNKDALIVRMQGFINSRTSFSDVCGSGYELIK 100
Sequência consenso LukE	KKGAVTQNVQFDPVKDKKYNKDALIVRMQGFINSRTSFSDVCGSGYELIK
Newman	RMIWPPQYNIIGLTTKDPNVSINTLPEKNIEETTDVGQTLGYNIGENPQSA 150
MW2	RMIWPPQYNIIGLTTKDPNVSINTLPEKNIEETTDVGQTLGYNIGENPQSA 150
USA_300_FPR3757	RMIWPPQYNIIGLTTKDPNVSINTLPEKNIEETTDVGQTLGYNIGENPQSA 150
COL	RMIWPPQYNIIGLTTKDPNVSINTLPEKNIEETTDVGQTLGYNIGENPQSA 150
USA_300_TCH1516	RMIWPPQYNIIGLTTKDPNVSINTLPEKNIEETTDVGQTLGYNIGENPQSA 150
N315	RMIWPPQYNIIGLTTKDPNVSINTLPEKNIEETTDVGQTLGYNIGENPQSA 150
D30	RMIWPPQYNIIGLTTKDPNVSINTLPEKNIEETTDVGQTLGYNIGENPQSA 150
M250	RMIWPPQYNIIGLTTKDPNVSINTLPEKNIEETTDVGQTLGYNIGENPQSA 150
TCH_70	RMIWPPQYNIIGLTTKDPNVSINTLPEKNIEETTDVGQTLGYNIGENPQSA 150
MRSAl31	RMIWPPQYNIIGLTTKDPNVSINTLPEKNIEETTDVGQTLGYNIGENPQSA 150
Sequência consenso LukE	RMIWPPQYNIIGLTTKDPNVSINTLPEKNIEETTDVGQTLGYNIGENPQSA
Newman	PSIGGGNGSPNYSETISYTQKSYVSEVDKQNSKSVKGVEANEFVTPDGKK 200
MW2	PSIGGGNGSPNYSETISYTQKSYVSEVDKQNSKSVKGVEANEFVTPDGKK 200
USA_300_FPR3757	PSIGGGNGSPNYSETISYTQKSYVSEVDKQNSKSVKGVEANEFVTPDGKK 200
COL	PSIGGGNGSPNYSETISYTQKSYVSEVDKQNSKSVKGVEANEFVTPDGKK 200
USA_300_TCH1516	PSIGGGNGSPNYSETISYTQKSYVSEVDKQNSKSVKGVEANEFVTPDGKK 200
N315	PSIGGGNGSPNYSETISYTQKSYVSEVDKQNSKSVKGVEANEFVTPDGKK 200
D30	PSIGGGNGSPNYSETISYTQKSYVSEVDKQNSKSVKGVEANEFVTPDGKK 200
M250	PSIGGGNGSPNYSETISYTQKSYVSEVDKQNSKSVKGVEANEFVTPDGKK 200
TCH_70	PSIGGGNGSPNYSETISYTQKSYVSEVDKQNSKSVKGVEANEFVTPDGKK 200
MRSAl31	PSIGGGNGSPNYSETISYTQKSYVSEVDKQNSKSVKGVEANEFVTPDGKK 200
Sequência consenso LukE	PSIGGGNGSPNYSETISYTQKSYVSEVDKQNSKSVKGVEANEFVTPDGKK
Newman	SAHDRLYLFVQSPNGPTGSAREYFAPCNQLPPLVQSGFNPSETITLSEHKG 250
MW2	SAHDRLYLFVQSPNGPTCSAREYFAPCNQLPPLVQSGFNPSETITLSEHKG 250
USA_300_FPR3757	SAHDRLYLFVQSPNGPTCSAREYFAPCNQLPPLVQSGFNPSETITLSEHKG 250
COL	SAHDRLYLFVQSPNGPTGSAREYFAPCNQLPPLVQSGFNPSETITLSEHKG 250
USA_300_TCH1516	SAHDRLYLFVQSPNGPTGSAREYFAPCNQLPPLVQSGFNPSETITLSEHKG 250
N315	SAHDRLYLFVQSPNGPTGSAREYFAPCNQLPPLVQSGFNPSETITLSEHKG 250
D30	SAHDRLYLFVQSPNGPTGSAREYFAPCNQLPPLVQSGFNPSETITLSEHKG 250
M250	SAHDRLYLFVQSPNGPTGSAREYFAPCNQLPPLVQSGFNPSETITLSEHKG 250
TCH_70	SAHDRLYLFVQSPNGPTGSAREYFAPCNQLPPLVQSGFNPSETITLSEHKG 250
MRSAl31	SAHDRLYLFVQSPNGPTGSAREYFAPCNQLPPLVQSGFNPSETITLSEHKG 250
Sequência consenso LukE	SAHDRLYLFVQSPNGPTCSAREYFAPCNQLPPLVQSGFNPSETITLSEHKG

Newman	SSDTSEFEISYGRNLIDITYATLFPRTGTYAERKHNAFVNPNFVVRYEVNW	300
MW2	SSDTSEFEISYGRNLIDITYATLFPRTGTYAERKHNAFVNPNFVVRYEVNW	300
USA_300_FPR3757	SSDTSEFEISYGRNLIDITYATLFPRTGTYAERKHNAFVNPNFVVRYEVNW	300
COL	SSDTSEFEISYGRNLIDITYATLFPRTGTYAERKHNAFVNPNFVVRYEVNW	300
USA_300_TCH1516	SSDTSEFEISYGRNLIDITYATLFPRTGTYAERKHNAFVNPNFVVRYEVNW	300
N315	SSDTSEFEISYGRNLIDITYATLFPRTGTYAERKHNAFVNPNFVVRYEVNW	300
D30	SSDTSEFEISYGRNLIDITYATLFPRTGTYAERKHNAFVNPNFVVRYEVNW	300
Mu50	SSDTSEFEISYGRNLIDITYATLFPRTGTYAERKHNAFVNPNFVVRYEVNW	300
TCH_70	SSDTSEFEISYGRNLIDITYATLFPRTGTYAERKHNAFVNPNFVVRYEVNW	300
MRSA131	SSDTSEFEISYGRNLIDITYATLFPRTGTYAERKHNAFVNPNFVVRYEVNW	300

Sequência consenso LukE	SSDTSEFEISYGRNLIDITYATLFPRTGTYAERKHNAFVNPNFVVRYEVNW	

Newman	KTHEIPIVKKGHN	311
MW2	KTHEIPIVKKGHN	311
USA_300_FPR3757	KTHEIPIVKKGHN	311
COL	KTHEIPIVKKGHN	311
USA_300_TCH1516	KTHEIPIVKKGHN	311
N315	KTHEIPIVKKGHN	311
D30	KTHEIPIVKKGHN	311
Mu50	KTHEIPIVKKGHN	311
TCH_70	KTHEIPIVKKGHN	311
MRSA131	KTHEIPIVKKGHN	311

Sequência consenso LukE	KTHESIKVKKGHN	

→ Representa o inicio da proteína LukD secretada.

Tabela 2 - Alinhamento de sequência LukD de Aminoácido

Newman	MKMKKLVKSSEVASSIAALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT	50 SEQ ID NO:12
MW2	MKMKKLVKSSEVASSIAALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT	50 SEQ ID NO:13
USA_300_FPR3757	MKMKKLVKSSEVASSIAALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT	50 SEQ ID NO:14
COL	MKMKKLVKSSEVASSIAALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT	50 SEQ ID NO:15
USA_300_TCH1516	MKMKKLVKSSEVASSIAALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT	50 SEQ ID NO:16
MRSA131	MKMKKLVKSSEVASSIAALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT	50 SEQ ID NO:17
TCH_70	MKMKKLVKSSEVASSIAALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT	50 SEQ ID NO:18
D30	MKMKKLVKSSEVASSIAALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT	50 SEQ ID NO:19
N315	MKMKKLVKSSEVASSIAALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT	50 SEQ ID NO:20
Mu50	MKMKKLVKSSEVASSIAALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT	50 SEQ ID NO:21

Sequência consenso LukD	MKMKKLVKSSEVASSIAALLLLSNTVDAAQHITPVSEKKVDDKITLYKTTAT	50 SEQ ID NO:22

Newman	SINDKLNISQILTENFIKDKEYDKDTLVKAAGNINSGYKPKNPKDYNYS	100
MW2	SINDKLNISQILTENFIKDKEYDKDTLVKAAGNINSGYKPKNPKDYNYS	100
USA_300_FPR3757	SINDKLNISQILTENFIKDKEYDKDTLVKAAGNINSGYKPKNPKDYNYS	100
COL	SINDKLNISQILTENFIKDKEYDKDTLVKAAGNINSGYKPKNPKDYNYS	100
USA_300_TCH1516	SINDKLNISQILTENFIKDKEYDKDTLVKAAGNINSGYKPKNPKDYNYS	100
MRSA131	SINDKLNISQILTENFIKDKEYDKDTLVKAAGNINSGYKPKNPKDYNYS	100
TCH_70	SINDKLNISQILTENFIKDKEYDKDTLVKAAGNINSGYKPKNPKDYNYS	100
D30	SINDKLNISQILTENFIKDKEYDKDTLVKAAGNINSGYKPKNPKDYNYS	100
N315	SINDKLNISQILTENFIKDKEYDKDTLVKAAGNINSGYKPKNPKDYNYS	100
Mu50	SINDKLNISQILTENFIKDKEYDKDTLVKAAGNINSGYKPKNPKDYNYS	100

Sequência consenso LukD	SINDKLNISQILTENFIKDKEYDKDTLVKAAGNINSGYKPKNPKDYNYS	

Newman	GTYWGEGHNVVSVSEKNDIAVNNVWVYAPKNQNEEFQVQQTLYGYSYGGDINI	150
MW2	GTYWGEGHNVVSVSEKNDIAVNNVWVYAPKNQNEEFQVQQTLYGYSYGGDINI	150
USA_300_FPR3757	GTYWGEGHNVVSVSEKNDIAVNNVWVYAPKNQNEEFQVQQTLYGYSYGGDINI	150
COL	GTYWGEGHNVVSVSEKNDIAVNNVWVYAPKNQNEEFQVQQTLYGYSYGGDINI	150
USA_300_TCH1516	GTYWGEGHNVVSVSEKNDIAVNNVWVYAPKNQNEEFQVQQTLYGYSYGGDINI	150
MRSA131	GTYWGEGHNVVSVSEKNDIAVNNVWVYAPKNQNEEFQVQQTLYGYSYGGDINI	150
TCH_70	GTYWGEGHNVVSVSEKNDIAVNNVWVYAPKNQNEEFQVQQTLYGYSYGGDINI	150
D30	GTYWGEGHNVVSVSEKNDIAVNNVWVYAPKNQNEEFQVQQTLYGYSYGGDINI	150
N315	GTYWGEGHNVVSVSEKNDIAVNNVWVYAPKNQNEEFQVQQTLYGYSYGGDINI	150
Mu50	GTYWGEGHNVVSVSEKNDIAVNNVWVYAPKNQNEEFQVQQTLYGYSYGGDINI	150

Sequência consenso LukD	GTYWGEGHNVVSVSEKNDIAVNNVWVYAPKNQNEEFQVQQTLYGYSYGGDINI	

Newman	SGNLGGGNGGSKSFSETINYQESYRPTTDRKTNHESIGGWGEVAHEIMNN	200
MW2	SGNLGGGNGGSKSFSETINYQESYRPTTDRKTNHESIGGWGEVAHEIMNN	200
USA_300_FPR3757	SGNLGGGNGGSKSFSETINYQESYRPTTDRKTNHESIGGWGEVAHEIMNN	200
COL	SGNLGGGNGGSKSFSETINYQESYRPTTDRKTNHESIGGWGEVAHEIMNN	200
USA_300_TCH1516	SGNLGGGNGGSKSFSETINYQESYRPTTDRKTNHESIGGWGEVAHEIMNN	200
MRSA131	SGNLGGGNGGSKSFSETINYQESYRPTTDRKTNHESIGGWGEVAHEIMNN	200
TCH_70	SGNLGGGNGGSKSFSETINYQESYRPTTDRKTNHESIGGWGEVAHEIMNN	200

D30	SNGLSGGLNGCKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHESIGWGVEAHKIMNN	200
N315	SNGLSGGLNGCKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHESIGWGVEAHKIMNN	200
Mu50	SNGLSGGLNGCKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHESIGWGVEAHKIMNN	200
Sequência consenso LukD	SNGLSGGLNGCKSFSETINYKQESYRTTIDRKTNHESIGWGVEAHKIMNN	*****
Newman	GNGPYCROSYOPTYGNELFLGGRQSSNAQNPLFTHQMPILLARGNPNPE	250
MW2	GNGPYCROSYOPTYGNELFLGGRQSSNAQNPLFTHQMPILLARGNPNPE	250
USA_300_FPR3757	GNGPYCROSYOPTYGNELFLGGRQSSNAQNPLFTHQMPILLARGNPNPE	250
COL	GNGPYCROSYOPTYGNELFLGGRQSSNAQNPLFTHQMPILLARGNPNPE	250
USA_300_TCH1516	GNGPYCROSYOPTYGNELFLGGRQSSNAQNPLFTHQMPILLARGNPNPE	250
MRSAT31	GNGPYCROSYOPTYGNELFLGGRQSSNAQNPLFTHQMPILLARGNPNPE	250
TCH_70	GNGPYCROSYOPTYGNELFLGGRQSSNAQNPLFTHQMPILLARGNPNPE	250
D30	GNGPYCROSYOPTYGNELFLGGRQSSNAQNPLFTHQMPILLARGNPNPE	250
N315	GNGPYCROSYOPTYGNELFLGGRQSSNAQNPLFTHQMPILLARGNPNPE	250
Mu50	GNGPYCROSYOPTYGNELFLGGRQSSNAQNPLFTHQMPILLARGNPNPE	250
Sequência consenso LukD	GNGPYCROSYOPTYGNELFLGGRQSSNAQNPLFTHQMPILLARGNPNPE	*****
Newman	PISVLSHKQNDTKKS KIKVTVYQREM DRYTNQWNRLHEWVGNNYENQNTVTF	300
MW2	PISVLSHKQNDTKKS KIKVTVYQREM DRYTNQWNRLHEWVGNNYENQNTVTF	300
USA_300_FPR3757	PISVLSHKQNDTKKS KIKVTVYQREM DRYTNQWNRLHEWVGNNYENQNTVTF	300
COL	PISVLSHKQNDTKKS KIKVTVYQREM DRYTNQWNRLHEWVGNNYENQNTVTF	300
USA_300_TCH1516	PISVLSHKQNDTKKS KIKVTVYQREM DRYTNQWNRLHEWVGNNYENQNTVTF	300
MRSAT31	PISVLSHKQNDTKKS KIKVTVYQREM DRYTNQWNRLHEWVGNNYENQNTVTF	300
TCH_70	PISVLSHKQNDTKKS KIKVTVYQREM DRYTNQWNRLHEWVGNNYENQNTVTF	300
D30	PISVLSHKQNDTKKS KIKVTVYQREM DRYTNQWNRLHEWVGNNYENQNTVTF	300
N315	PISVLSHKQNDTKKS KIKVTVYQREM DRYTNQWNRLHEWVGNNYENQNTVTF	300
Mu50	PISVLSHKQNDTKKS KIKVTVYQREM DRYTNQWNRLHEWVGNNYENQNTVTF	300
Sequência consenso LukD	PISVLSHKQNDTKKS KIKVTVYQREM DRYTNQWNRLHEWVGNNYENQNTVTF	*****
Newman	TSTYEVDWQNHHTVKLIGTDSEKEINPGV	327
MW2	TSTYEVDWQNHHTVKLIGTDSEKEINPGV	327
USA_300_FPR3757	TSTYEVDWQNHHTVKLIGTDSEKEINPGV	327
COL	TSTYEVDWQNHHTVKLIGTDSEKEINPGV	327
USA_300_TCH1516	TSTYEVDWQNHHTVKLIGTDSEKEINPGV	327
MRSAT31	TSTYEVDWQNHHTVKLIGTDSEKEINPGV	327
TCH_70	TSTYEVDWQNHHTVKLIGTDSEKEINPGV	327
D30	TSTYEVDWQNHHTVKLIGTDSEKEINPGV	327
N315	TSTYEVDWQNHHTVKLIGTDSEKEINPGV	327
Mu50	TSTYEVDWQNHHTVKLIGTDSEKEINPGV	327
Sequência consenso LukD	TSTYEVDWQNHHTVKLIGTDSEKEINPGV	*****

→ Representa o início da proteína LukD secretada

[0032] Assim, salvo se indicado de modo contrário, ambas as formas madura e imatura de LukE e LukD nativas, e as sequências contendo menos do que 100% de similaridade com LukE e LukD nativas (ou seja, sequências nativas e análogos parecidos, coletivamente referenciados aqui como "LukE" e "LukD") podem ser usados nos métodos da presente invenção.

[0033] As proteínas LukE e LukD e polipeptídeos da invenção podem diferir de polipeptídeos nativos designados como SEQ ID NOS:1-11 e 12-22 respectivamente, em termos de uma ou mais inserções de aminoácidos adicionais, substituições ou deleções, por exemplo, um ou mais resíduos de aminoácidos dentro das SEQ ID NOS:1-22 po-

dem ser substituídos por outro aminoácido de uma polaridade semelhante, que atuam como um equivalente funcional, em uma alteração silenciosa. Isto quer dizer, a alteração relativa à sequência nativa poderia não apreciavelmente diminuir as propriedades básicas de LukE ou LukD nativas. Como dito análogo de LukE ou LukD pode ser triado de acordo com os protocolos revelados aqui (por exemplo, o ensaio de toxicidade celular e o ensaio de lesão de membrana) para determinar se este mantém a atividade de LukE ou LukD nativa. As substituições dentro destes leucocidinas podem ser selecionadas de outros membros da classe à qual o aminoácido pertence. Por exemplo, aminoácidos não polares (hidrofóbicos) incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina. Aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparaginina e glutamina. Aminoácidos carregados positivamente (básicos) incluem arginina, lisina e histidina. Aminoácidos carregados negativamente (ácidos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico.

[0034] Em outras modalidades, alterações não corretivas (por exemplo, uma ou mais substituições de aminoácidos, deleções e/ou adições) podem ser feitas para fins de detoxificação e/ou LukD. Os LukE e LukD detoxificados podem ser usados nas composições de vacina ativa. Alterações moleculares podem ser obtidas por métodos bem conhecidos na técnica, incluindo extensão de iniciador em um molde de plasmídeo usando moldes em fita simples (Kunkel et al., *Proc. Acad. Sci., USA* 82:488-492 (1985), que está aqui incorporado por referência em sua totalidade), moldes de DNA de fita dupla (Paworth, et al., *Strategies* 9(3):3-4 (1996), que está aqui incorporado por referência em sua totalidade), e clonagem por PCR (Braman, J. (ed.), *IN VITRO MUTAGENESIS PROTOCOLS*, 2nd ed. Humana Press, Totowa, N.J. (2002), que está aqui incorporado por referência em sua totalidade). Métodos para determinar se uma determinação alteração

molecular em LukE e LukD reduz a citotoxicidade de LukE/D são descritos aqui.

[0035] Em uma modalidade preferencial da presente invenção, uma preparação altamente purificada de LukE/LukD é utilizada. Exemplos incluem proteínas LukE e LukD ou polipeptídeos purificados das várias cepas exemplificadas nas tabelas 1 e 2. Os métodos para purificar toxinas LukE e LukD são conhecidos na técnica (Gravet et al., "Characterization of a Novel Structural Member, LukE-LukD, of the Bi-Component Staphylococcal Leucotoxins Family," *FEBS* 436: 202-208 (1998), que está aqui incorporado por referência em sua totalidade). Como usado aqui, proteína "isolada" ou polipeptídeo refere-se a uma proteína ou polipeptídeo que foi separado de outras proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos com os quais está naturalmente associado. A pureza pode ser medida por qualquer método padrão apropriado, por exemplo, por cromatografia em coluna, eletroforese em gel de poliacrilamida, de análise de HPLC. Uma proteína isolada ou polipeptídeo da invenção pode ser purificada a partir de uma fonte natural, produzida por técnicas de DNA recombinante ou por métodos químicos.

[0036] Em uma modalidade deste aspecto da presente invenção, a proteína isolada LukE ou LukD ou polipeptídeo da mesma da composição está ligada a uma molécula carreadora imunogênica. Em alguns casos, a molécula carreadora imunogênica pode ser covalentemente ou não covalentemente ligada à proteína ou peptídeo imunogênico. Moléculas carreadoras imunogênicas exemplares incluem, entre outras, albumina sérica bovina, ovoalbumina de ovo de galinha, hemocianina de *keyhole limpet*, toxoide tetenico, toxoide diftérico, tiroglobulina, um polissacarídeo capsular de pneumococos, CRM 197, e uma proteína da membrana externa de meningococos.

[0037] Em determinadas modalidades da presente invenção, a composição pode ainda conter um ou mais antígenos adicionais de *S.*

aureus. Antígenos apropriados de *S. aureus* incluem, entre outros, antígeno alfa hemolisina, proteína A, um antígeno polissacarídeo de soro tipo 336, coagulase, fator de aglutinação A, fator de aglutinação B, uma proteína de ligação a fibronectina, uma proteína de ligação ao fibrinogênio, uma proteína de ligação ao colágeno, uma proteína de ligação a elastina, uma proteína análoga à MHC, um polissacarídeo de adesão intracelular, beta hemolisina, delta hemolisina, gama hemolisina, leucocidina Panton-Valentine, leucocidina A, leucocidina B, leucocidina M, toxina A esfoliativa, toxina B esfoliativa, protease V8, liase hialuronato, lipase, estafiloquinase, uma enterotoxina, toxina de síndrome de choque séptico 1, poli-N-succinil beta-1→6 glucosamina, catalase, beta-lactamase, ácido teicoico, peptidoglicano, uma proteína de ligação à penicilina, proteína de inibição de quimiotaxia, inibidor de complemento, Sbi, antígeno tipo 5, antígeno tipo 8, ácido lipoteicoico, e proteínas de superfície microbiana que reconhecem proteínas hospedeiras (por exemplo, determinantes de superfície de ferro, proteínas de repetição de serina-aspartato).

[0038] De acordo com este aspecto da invenção, a composição pode ainda compreender um ou mais adjuvantes. Adjuvantes apropriados são conhecidos na técnica e incluem, entre outros, flagelina, adjuvante completo ou incompleto de Freund, hidróxido de alumínio, lisolecitina, poliois plurônicos, polianions, peptídeos, emulsão de óleo, dinitrofenol, iscomatriz, e partículas de DNA policación de lipossoma.

[0039] Nas modalidades em que a composição terapêutica é pretendida para uso como uma vacina ativa, as proteínas LukE e/ou LukD ou polipeptídeos podem ser alterados de modo a apresentar toxicidade reduzida. Alterações para afins de redução de toxicidade de LukE e LukD incluem tratamento químico (por exemplo, modificação de resíduos de aminoácidos específicos como descrito *supra*) ou conjugação a outra fração (por exemplo, a outro antígeno bacteriano, como um

polissacarídeo bacteriano ou uma glicoproteína bacteriana). Alterações químicas à outras toxinas de *S. aureus* para fins de detoxificação (ou reduzir a toxicidade) são conhecidos. Métodos para determinar se determinada alteração reduz toxicidade de LukE ou LukD são conhecidos na técnica e/ou descritos aqui.

[0040] As composições terapêuticas da presente invenção são preparadas por formulação de LukE e LukD com um carreador farmaceuticamente aceitável e opcionalmente um excipiente farmaceuticamente aceitável. Como usado aqui, os termos "carreador farmaceuticamente aceitável" e "excipiente farmaceuticamente aceitável" (por exemplo, aditivos como diluentes, imunoestimulantes, adjuvantes, antioxidantes, preservativos e agentes de solubilização) são não tóxicos à célula ou mamífero sendo exposto a este nas dosagens e concentrações empregadas. Exemplos de carreadores farmaceuticamente aceitáveis incluem água, por exemplo, tamponada com fosfato, citrato e outro ácido orgânico. Exemplos representativos de excipientes farmaceuticamente aceitáveis que podem ser úteis na presente invenção incluem antioxidantes como ácido ascórbico; polipeptídeos de baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos); proteínas, como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; adjuvantes (selecionados de modo a evitar toxicidade induzida por adjuvante, como β-glucano como descrito na patente US 6.355.625, que está aqui incorporada por referência em sua totalidade, ou um fator estimulante de granulócito (GCSF)); polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoóis de açúcar como manitol ou sorbitol; contraíons formadores de sal como sódio; e/ou surfactantes não iônicos como TWEEN®, polietileno glicol (PEG), e PLURONICS®.

[0041] Composições terapêuticas da presente invenção podem ser preparadas para armazenamento por mistura dos ingredientes ativos contendo o grau desejado de pureza com o carreador farmaceuticamente aceitável e excipiente opcional e/ou agente ativo adicional, na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas.

[0042] Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para imunizar contra uma infecção por *Staphylococcus aureus* em um sujeito. Este método envolve administrar uma composição da presente invenção, em uma quantidade efetiva para minimizar contra infecção por *S. aureus* no sujeito. Um sujeito apropriado para tratamento de acordo com este aspecto da presente invenção é um sujeito em risco de desenvolver uma infecção por *S. aureus*.

[0043] De acordo com este aspecto da invenção, uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição para administração à um sujeito para imunizar contra infecção por *S. aureus* é a quantidade necessária para gerar uma resposta imune humoral (*ou seja*, mediada por anticorpo). Preferencialmente, a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição da presente invenção induz uma resposta imune neutralizante contra *S. aureus* no sujeito. Para efetuar uma resposta imune efetiva em um sujeito, a composição pode ainda conter um ou mais抗ígenos adicionais de *S. aureus* ou um adjuvante como descrito *supra*. Em uma modalidade alternativa deste aspecto da invenção, o adjuvante é administrado separadamente da composição ao sujeito, antes, depois ou concomitante com a administração da composição da presente invenção.

[0044] Os modos de administração e dosagem terapeuticamente eficaz relacionadas à este aspecto da invenção são descritos *infra*.

[0045] Outro aspecto da presente invenção refere-se a uma composição compreendendo quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo selecionado do grupo que consiste em um anticorpo Leuco-

cidina E (LukE), um anticorpo Leucocidina D (LukD), ou uma combinação das mesmas, em um carreador farmaceuticamente aceitável.

[0046] Em uma modalidade deste aspecto da presente invenção, a composição compreende um anticorpo LukE ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Anti corpos LukE apropriados incluem aqueles que reconhecem um ou mais epítópos em uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO:11. Da mesma forma, em outra modalidade, a composição compreende um anticorpo LukD ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Anticorpos LukD apropriados reconhecem um ou mais epítópos em uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO:22. Em outra modalidade da invenção, a composição compreende ambos anticorpos LukE e LukD ou fragmentos de ligação ao antígeno do mesmo. Preferencialmente, a composição compreende um ou mais anticorpos LukE e/ou LukD neutralizantes. Ainda em outra modalidade, a composição de anticorpo anti-LukE e/ou anti-LukD é multivalente de modo que esta também contenha um anticorpo que especificamente se liga a outro antígeno bacteriano (e que opcionalmente neutraliza outro antígeno bacteriano). Por exemplo, a composição pode compreender um ou mais anticorpos que reconhecem um ou mais抗ígenos adicionais *S. aureus*, incluindo, entre outros, um ou mais dos抗ígenos *S. aureus* descritos *supra*.

[0047] Para fins da presente invenção, o termo "anticorpo" inclui anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, fragmentos de anticorpo, formas geneticamente modificadas dos anticorpos e combinações dos mesmos. Mais especificamente, o termo "anticorpo," que é usado de modo intercambiável com o termo "imunoglobulina," inclui moléculas de imunoglobulina completas (*ou seja*, de ocorrência natural ou formadas por processos de recombinação de fragmento gene de imunoglobulina normal) (por exemplo, um anticorpo IgG) e fragmentos imunologicamente ativos dos mesmos (*ou seja*, incluindo a parte de

ligação específica da molécula de imunoglobulina completa), que novamente pode ser de ocorrência natural ou sintético em natureza. Assim, o termo "fragmento de anticorpo" inclui uma parte de um anticorpo como F(ab')₂, F(ab)₂, Fab', Fab, Fv, scFv e semelhantes. Independente da estrutura, um fragmento de anticorpo se liga com o mesmo antígeno que é reconhecido pelo anticorpo completo, e, no contexto da presente invenção, especificamente se liga ao complexo LukE, LukD, ou LukE/D. Métodos para preparar e triar fragmentos de anticorpo são bem conhecidos na técnica.

[0048] Na presente invenção, os anticorpos anti-LukE têm algum grau de reatividade cruzada com outras subunidade S de leucocidina Staphylococcus como HlgC, LukS-PVL, HlgA, LukS-I, LukA, e LukM. Da mesma forma, em algumas modalidades, os anticorpos anti-LukD da presente invenção podem ter algum grau de reatividade cruzada com outras subunidades F de leucocidina Staphylococcus como LukF'-PV, LukF-PV, LukB, LukF-I, e HlgB. Anticorpos anti-LukE e/ou anti-LukD podem inibir ou reduzir atividade LukE e atividade de LukD, respectivamente. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-LukE e/ou anti-LukD neutralizam (por exemplo, substancialmente eliminam) atividade LukE e LukD, respectivamente.

[0049] Anticorpos de ocorrência natural tipicamente têm duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas, com cada cadeia leve covalentemente ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto intercadeia e várias ligações dissulfeto ainda ligadas às duas cadeias pesadas uma à outra. As cadeias individuais podem dobrar em domínios contendo tamanhos semelhantes (110-125 aminoácidos) e estruturas, mas diferentes funções. A cadeia leve pode compreender um domínio variável (VL) e/ou um domínio constante (CL). A cadeia pesada pode ainda compreender um domínio variável (VH) e/ou, dependendo da classe ou isotipo de anticorpo, três ou quatro domínios

constantes (CH1, CH2, CH3 e CH4). Em humanos, os isotipos são IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, com IgA e IgG ainda subdividido em subclasses ou subtipos (IgA1-2 e IgG1-4).

[0050] Geralmente, os domínios variáveis mostram variabilidade de sequência de aminoácido considerável de um anticorpo ao seguinte, particularmente no local do sítio de ligação ao antígeno. Três regiões, chamadas de regiões hiper variáveis determinantes de complementaridade (CDRs), são encontrados em cada um de VL e VH, que são suportados por regiões menos variáveis chamadas regiões estruturais variáveis. Os anticorpos inventivos incluem anticorpos monoclonais IgG bem como fragmentos de anticorpo ou formas projetadas. Estes são, por exemplo, fragmentos Fv, ou proteínas em que as CDRs e/ou domínios variáveis dos anticorpos exemplificados são projetados como proteínas de ligação ao antígeno de cadeia simples.

[0051] A porção de um anticorpo que consiste em domínios VL e VH é designada como um Fv (fragmento variável) e constitui o sítio de ligação ao antígeno. Um Fv de cadeia simples (scFv ou SCA) é um fragmento de anticorpo contendo um domínio VL e um domínio VH em uma cadeia de polipeptídeo, em que o N terminal de um domínio e o C terminal do outro domínio são unidos por um ligante flexível. Os ligantes de peptídeo usados para produzir os anticorpos de cadeia simples são peptídeos tipicamente flexíveis, selecionados para garantir que a dobra tridimensional apropriada do domínio VL e VH ocorre. O ligante é geralmente 10 a 50 resíduos de aminoácidos, e em alguns casos é mais curto, por exemplo, cerca de 10 a 30 resíduos de aminoácidos, ou 12 a 30 resíduos de aminoácidos, ou ainda 15 a 25 resíduos de aminoácidos. Um exemplo de ditos peptídeos ligantes inclui repetições de quatro resíduos de glicina seguido por um resíduo de serina.

[0052] Anticorpos de cadeia simples são desprovidos de alguns ou todos os domínios constantes dos anticorpos completos dos quais são

derivados. Portanto, podem superar alguns dos problemas associados com o uso de anticorpos completos. Por exemplo, anticorpos de cadeia simples tendem a estar livres de certas interações indesejadas entre regiões constantes de cadeia pesada e outras moléculas biológicas. Além disso, anticorpos de cadeia simples são consideravelmente menores do que anticorpos completos e podem ter maior permeabilidade do que anticorpos completos, permitindo que anticorpos de cadeia simples se localizem e se liguem aos sítios de ligação ao antígeno alvo de modo mais eficientemente. Além disso, o tamanho relativamente pequeno de anticorpo de cadeia simples o torna menos provável a provocar uma resposta imune indesejada em um recipiente do que os anticorpos inteiros.

[0053] Fab (Fragmento, ligação ao antígeno) refere-se aos fragmentos do anticorpo que consistem em domínios VL, CL, VH, e CH1. Aqueles gerados após digestão por papaína simplesmente são referenciados como Fab e não retêm a região em dobradiça de cadeia pesada. Após a digestão por papaína, vários Fabs retendo a dobradiça de cadeia pesada são geradas. Aqueles fragmentos com as ligações dissulfeto intercadeia intactas são referenciados como $F(ab')_2$, enquanto um Fab' único resulta quando as ligações dissulfeto não são retidas. Fragmentos $F(ab')_2$ têm maior avidez para antígeno que os fragmentos Fab monovalentes.

[0054] Fc (cristalização de fragmento) é a designação para a parte ou fragmento de um anticorpo que comprehende domínios constantes de cadeia pesada pareados. Em um anticorpo IgG, por exemplo, o Fc comprehende domínios CH2 e CH3. O Fc de um anticorpo IgA ou um IgM ainda comprehende um domínio CH4. O Fc é associado com ligação ao receptor Fc, ativação de citotoxicidade mediada por complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Para anticorpos como IgA e IgM, que são complexos de várias proteínas

tipo IgG, formação complexa requer domínios constantes Fc.

[0055] Finalmente a região em dobradiça separa as partes Fab e Fc do anticorpo, fornecendo para mobilidade de Fabs em relação a cada outro e em relação a Fc, bem como incluindo várias ligações disulfeto para ligação covalente das duas cadeias pesadas.

[0056] "Especificidade" de anticorpo refere-se ao reconhecimento seletivo para um epítopo particular de um antígeno. O termo "epítopo" inclui qualquer determinante de proteína capaz de ligação específica a uma imunoglobulina ou receptor de célula T ou de outra forma interagindo com uma molécula. Determinantes de epítopo geralmente consistem em agrupamentos de superfície quimicamente ativa de moléculas como aminoácidos ou carboidratos ou cadeias laterais de açúcar e geralmente têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Um epítopo pode ser "linear" ou "conformacional". Em um epítopo linear, todos os pontos de interação entre a proteína e a molécula de interação (como um anticorpo) ocorrem linearmente ao longo da sequência de aminoácido primário da proteína. Em um epítopo conformacional, os pontos de interação ocorrem através de resíduos de aminoácidos na proteína que são separadas de uma outra, ou seja, aminoácidos não contíguos juntapostos por dobra terciária de uma proteína. Epítópos formados de aminoácidos contíguos são tipicamente retidos em exposição aos solventes desnaturantes, enquanto que epítópos formados por dobra terciária são tipicamente perdidos no tratamento com solventes desnaturantes. Um epítopo tipicamente inclui pelo menos 3 e mais geralmente, pelo menos, 5 ou 8-10 aminoácidos em uma única conformação espacial. Anticorpos que reconhecem o mesmo epítopo podem ser verificados em um imunoensaio simples que mostram a capacidade de um anticorpo em bloquear a ligação de outro anticorpo à um antígeno alvo.

[0057] Anticorpos monoclonais da presente invenção podem ser

murinos, humanos, humanizados ou quiméricos. Um anticorpo humanizado é uma proteína recombinante em que as CDRs de um anticorpo de uma espécie; por exemplo, um anticorpo de roedor, coelho, cão, cabra, cavalo ou de galinha (ou qualquer outro anticorpo animal apropriado), são transferidos em domínios humanos variáveis de cadeia pesada ou leve. Os domínios constantes da molécula de anticorpo são derivados daqueles de um anticorpo humano. Os métodos para preparar anticorpos humanizados são bem conhecidos na técnica. Anticorpos quiméricos preferencialmente têm regiões constantes derivados substancialmente ou exclusivamente de regiões constantes de anticorpo e regiões variáveis derivadas substancialmente ou exclusivamente da sequência da região variável de um mamífero além de um humano. O processo de quimerização pode ser feito mais efetivo por ainda substituindo as regiões variáveis - além das regiões hiper variáveis ou as regiões determinantes de complementaridade (CDRs), de um anticorpo murino (ou outro não mamífero não humano) com as sequências humanas correspondentes. As regiões variáveis além das CDRs são ainda conhecidas como as regiões estruturais variáveis (FRs). Ainda outros anticorpos monoclonais da presente invenção são biespecíficas, de modo que têm especificidade para ambas LukE e LukD. Anticorpos biespecíficos são preferencialmente humanos ou humanizados.

[0058] Os anticorpos descritos acima podem ser obtidos de acordo com as técnicas padrões. Por exemplo, LukE, LukD, ou um fragmento imunologicamente ativo de LukE ou LukD podem ser administrados à um sujeito (por exemplo, um mamífero como um humano ou camundongo). As leucocidinas podem ser usadas por si só como imunógenos ou podem ser ligados a uma proteína carreadora ou outros objetos como esferas de sefarose. Após o mamífero ter produzido anticorpos, uma mistura de células produtoras de anticorpos, como esplenócitos,

são isolados, dos quais anticorpos policlonais podem ser obtidos. Anticorpos monoclonais podem ser produzidos por isolamento de células produtoras de anticorpos individuais da mistura e imortalizar os mesmos por, por exemplo, fusão dos mesmos com células tumorais, como células de mieloma. Os hibridomas resultantes são preservados em cultura e os anticorpos monoclonais são coletados do meio de cultura.

[0059] Outro aspecto da presente invenção é direcionado à um método de prevenir a infecção por *S. aureus* e/ou condições associadas a *S. aureus* em um sujeito. Este método compreende administrar uma composição da invenção compreendendo um anticorpo selecionado do grupo que consiste em um anticorpo Leucocidina E (LukE), um anticorpo Leucocidina D (LukD), ou uma combinação das mesmas, em uma quantidade efetiva para prevenir infecção por *S. aureus* e/ou condição associada a *S. aureus* no sujeito.

[0060] De acordo com este aspecto da invenção, condições associadas a *S. aureus* incluem, entre outras, feridas e infecções de pele, abscessos de tecido, foliculite, osteomielite, pneumonia, síndrome de pele escaldada, septicemia, artrite séptica, miocardite, endocardite, e síndrome de choque tóxico.

[0061] Os modos de administração e dosagem terapeuticamente eficaz relacionadas à este aspecto da invenção são descritos infra.

[0062] Outro aspecto da presente invenção é direcionado a um método para tratar uma infecção por *S. aureus* e/ou condições associadas à *S. aureus* em um sujeito. Este método envolve administrar uma composição compreendendo um ou mais inibidores de citotoxicidade mediada por LukE/D em uma quantidade efetiva para tratar a infecção por *S. aureus* e/ou a condição associada à *S. aureus* no sujeito.

[0063] De acordo com este aspecto da invenção, inibidores apropriados de citotoxicidade mediada por LukE/D incluem inibidores de proteína ou peptídeo, inibidores de ácido nucleico, ou inibidores de

molécula pequena.

[0064] Em uma modalidade da invenção, o inibidor de citotoxicidade mediada por LukE/D é um inibidor LukE. Inibidores LukE apropriados incluem anticorpos ou fragmentos de anticorpo que reconhecem um epítopo em uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO:11. Em outra modalidade da invenção, o inibidor de citotoxicidade mediada por LukE/D é um inibidor LukD. Inibidores de LukD apropriados incluem anticorpos ou fragmentos de anticorpo que reconhecem um epítopo em uma sequência de aminoácido da SEQ ID NO:22.

[0065] Em outra modalidade deste aspecto da presente invenção, o inibidor de citotoxicidade mediada por LukE/D inibe a interação de LukE e LukD. Inibidores apropriados de acordo com esta modalidade incluem anticorpos anti-LukE e/ou LukD que direcionam as regiões de interação de LukE ou LukD. Alternativamente, inibidores apropriados incluem moléculas pequenas que se ligam às regiões de interação de LukE e/ou LukD. Estas regiões de interação podem incluir aminoácidos 3-13 da SEQ ID NO:11, aminoácidos 32-47 da SEQ ID NO:11, aminoácidos 126-139 da SEQ ID NO:11, aminoácidos 151-156 da SEQ ID NO:11, e aminoácidos 272-283 da SEQ ID NO:11. As regiões de interação podem ainda incluir aminoácidos: 3-17 da SEQ ID NO:22, aminoácidos 33-51 da SEQ ID NO:22, aminoácidos 94-113 da SEQ ID NO:22, aminoácidos 115-131 da SEQ ID NO:22, e aminoácidos 229-2741 da SEQ ID NO:22.

[0066] Em outra modalidade deste aspecto da presente invenção, o inibidor de citotoxicidade mediada por LukE/D inibe LukE/D de se ligar à membrana plasmática de leucócitos. Inibidores apropriados incluem anticorpos ou moléculas pequenas que reconhecem os epítópos de LukE e/ou LukD que interagem com a membrana plasmática de leucócitos. As regiões de LukE e LukD que interagem com a membrana plasmática incluem os aminoácidos que contêm o domínio rim de

LukE. Estas regiões de aminoácidos incluem aminoácidos LukE 57-75, da SEQ ID NO:11, aminoácidos 162-198 da SEQ ID NO:11, e aminoácidos 230-273 da SEQ ID NO:11 e aminoácidos LukD 59-75 da SEQ ID NO:22, aminoácidos 170-220 da SEQ ID NO:22, e aminoácidos 253-268 da SEQ ID NO:22. Assim, anticorpos que reconhecem estes epítulos de LukE e/ou LukD são particularmente apropriados para esta modalidade da invenção.

[0067] Em outra modalidade deste aspecto da presente invenção, o inibidor de citotoxicidade mediada por LukE/D é um agente que previne formação de complexo de oligômero LukE/D, um agente que bloqueia formação de poro mediada por LukE/LukD, ou um agente que bloqueia o poro LukE/LukD. De acordo com esta modalidade, inibidores apropriados do poro mediado por LukE/LukD incluem ciclodextrina e compostos relacionados, e qualquer outro inibidor de poro incluir inibidores de proteína ou peptídeo, inibidores de ácido nucleico, ou inibidores de molécula pequena.

[0068] Ainda em outra modalidade deste aspecto da presente invenção, o inibidor de citotoxicidade mediada por LukE/D é um agente que modula a expressão e/ou atividade de um repressor endógeno ou ativador de expressão de LukE/D. Assim, administrar um agente que induz ou imita a expressão e ou atividade de repressor de toxinas ("Rot"), que é um repressor de expressão de *lukE* e *lukD*, inibe a citotoxicidade mediada por LukE/D em virtude de bloquear a produção de toxina. Agentes apropriados que imitam a expressão de Rot e atividade são apropriadas para uso nos métodos da presente invenção são revelados na publicação de pedido de patente US 2003/0171563 para McNamara, que está aqui incorporado por referência em sua totalidade. Da mesma forma, administrar um agente que inibe a expressão ou atividade de SaeRS, que é um ativador da expressão de *lukE* e *lukD*, inibe a mediada por LukE/D em virtude de bloquear a produção de to-

xina.

[0069] Para fins deste e outros aspectos da invenção, o "sujeito" alvo inclui qualquer animal, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente um humano. No contexto da administração uma composição da invenção para fins de prevenir uma infecção por *S. aureus* em um sujeito, o sujeito alvo inclui qualquer sujeito que está em risco de ser infectado por *S. aureus*. Sujeitos particularmente susceptíveis incluem crianças e jovens, bem como jovens, adultos e idosos imunocomprometidos. No entanto, qualquer criança, jovem, adulto ou idoso ou indivíduo imunocomprometido em risco para infecção por *S. aureus* pode ser tratado de acordo com os métodos da presente invenção. No contexto da administração uma composição da invenção para fins de tratar uma infecção por *S. aureus* em um sujeito, a população de sujeito alvo inclui qualquer sujeito infectado com *S. aureus*. Sujeitos particularmente apropriados incluem aqueles em risco de infecção ou aqueles infectados com *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) ou *S. aureus* sensíveis a meticilina (MSSA).

[0070] No contexto do uso de composições terapêuticas da presente invenção para prevenir uma infecção por *S. aureus*, vacinação ativa ou passiva, a concentração de proteínas LukE e LukD ou polipeptídeos ou anticorpos anti-LukE e anti-LukD na composição são adequadas para obter a prevenção de infecção por *S. aureus*, particularmente a prevenção de *S. aureus* em populações susceptíveis. No contexto do uso de composições terapêuticas para tratar uma infecção por *S. aureus*, as quantidades de anticorpos de anti-LukE e anti-LukD ou agentes que inibem a citotoxicidade mediada por LukE/D são capazes de obter uma redução em um número de sintomas, uma redução na gravidade de pelo menos um sintoma, ou um retardamento na outra progressão de pelo menos um sintoma ou ainda um alívio total da infecção.

[0071] Quantidades terapeuticamente eficazes de LukE, LukD, anticorpos anti-LukE e anti-LukD, e agentes que inibem a citotoxicidade mediada por LukE/D podem ser determinadas de acordo com procedimentos padrões, que leva vários fatores em conta, incluindo, por exemplo, a concentrações destes agentes ativos na composição, o modo e frequência de administração, a gravidade de infecção por *S. aureus* a ser tratada (ou prevenida), e detalhes do sujeito como idade, peso e saúde geral e condição imune. O guia geral pode ser encontrado, por exemplo, nas publicações de *International Conference on Harmonization* e em REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Company 1990), que está aqui incorporado por referência em sua totalidade. Um médico pode administrar LukE e LukD ou anticorpo anti-LukE e anti-LukD, até uma dosagem ser atingida que fornece o efeito profilático desejado ou requerido ou efeito terapêutico. O progresso desta terapia pode ser facilmente monitorado por ensaios convencionais.

[0072] As quantidades terapeuticamente eficazes de LukE e LukD para imunização irão depender se o adjuvante é coadministrado, com dosagens maiores sendo requeridas na ausência de adjuvante. A quantidade de LukE e LukD para administração as vezes varia de 1 μ g-500 μ g por paciente e mais geralmente de 5-500 μ g por injeção para administração humana. Ocasionalmente, uma dose maior de 1-2mg por injeção é usada. Tipicamente cerca de 10, 20, 50 ou 100 μ g é usado para cada injeção humana. Preferencialmente, as quantidades de LukE e LukD são substancialmente as mesmas. O tempo de injeções pode variar significativamente de uma vez ao dia, a uma vez ao ano, a uma vez a cada década. Geralmente, uma dosagem efetiva pode ser monitorada obtendo-se uma amostra fluida do sujeito, geralmente uma amostra sérica, e determinando o título do anticorpo desenvolvido contra a proteína LukE e LukD ou polipeptídeo, usando métodos bem co-

nhecidos na técnica e prontamente adaptáveis ao antígeno específico a ser medido. Idealmente, uma amostra é tomada antes da dosagem inicial e amostras subsequentes são tomadas e tituladas após cada imunização. Geralmente, uma dose ou cronograma de dosagem que fornece um título detectável pelo menos quatro vezes maior do que o controle ou níveis de "fundo" em uma diluição sérica de 1:100 é desejável, onde o fundo é definido em relação a um soro de controle ou em relação ao fundo de uma placa em ensaios de ELISA.

[0073] Quantidade terapeuticamente eficaz das composições de anticorpo LukE e LukD tipicamente são pelo menos 50 mg de composição por quilograma de peso corporal (mg/kg), incluindo pelo menos 100 mg/kg, pelo menos 150 mg/kg, pelo menos 200 mg/kg, pelo menos 250 mg/kg, pelo menos 500 mg/kg, pelo menos 750 mg/kg e pelo menos 1000 mg/kg, por dose em uma base diária. As dosagens para composições de anticorpo monoclonal podem tender a ser menores, como cerca de um décimo das composições de anticorpo não monoclonal, como pelo menos cerca de 5 mg/kg, pelo menos cerca de 10 mg/kg, pelo menos cerca de 15 mg/kg, pelo menos cerca de 20 mg/kg, ou pelo menos cerca de 25 mg/kg. Em alguns métodos, dois ou mais anticorpos monoclonais com diferentes especificidades de ligação são administrados simultaneamente, em cujo caso a dosagem de cada anticorpo administrado cai dentro das faixas indicadas. O anticorpo é geralmente administrado em várias ocasiões. Os intervalos entre dosagens simples podem ser semanais, mensais ou anuais. Os intervalos podem ainda ser irregulares como indicado medindo-se os níveis sanguíneos de anticorpo no sujeito. Alternativamente, anticorpo pode ser administrado como uma formulação de liberação sustentada, em cujo caso a administração menos frequente é requerida. A dosagem e frequência variam dependendo das meias-vidas do anticorpo no sujeito. Em geral, anticorpos humanos mostram a maior meia-vida, seguido

por anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos e anticorpos não humanos. A dosagem e frequência de administração podem variar dependendo de se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é administrada em intervalos relativamente infrequentes por um período de tempo longo. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta em intervalos relativamente curtos é, algumas vezes requerida até a progressão da doença ser reduzida ou terminada, e preferencialmente até o sujeito mostrar melhora parcial ou completa de sintomas da doença.

[0074] As composições terapêuticas da presente invenção podem ser administradas como parte de uma terapia de combinação em conjunto com outro agente ativo, dependendo da natureza da infecção por *S. aureus* que está sendo tratada. Ditos agentes ativos adicionais incluem agentes anti-infecciosos, agentes antibióticos e agentes antimicrobianos. Agentes anti-infecciosos representativos que podem ser úteis na presente invenção incluem vancomicina e lisostafina. Agentes antibióticos representativos e agentes antimicrobianos que podem ser úteis na presente invenção incluem penicilinas resistentes a penicilinase, cefalosporinas e carbapenems, incluindo vancomicina, lisostafina, penicilina G, ampicilina, oxacilina, nafcicina, cloxacilina, dicloxacilina, cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefradina, cefamandol, cefoxitina, imipenem, meropenem, gentamicina, teicoplanina, lincomicina e clindamicina. As dosagens destes antibióticos são bem conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, MERCK MANUAL OF DIAGNOSIS AND THERAPY, Section 13, Ch. 157, 100th Ed. (Beers & Berkow, eds., 2004), que está aqui incorporado por referência em sua totalidade. Os agentes anti-inflamatórios, anti-infecciosos, antibióticos e/ou antimicrobianos podem ser combinados antes da administração ou administrados concomitantemente (como parte da mesma composição ou por meio de uma composição diferente) ou sequencialmente com a com-

posição terapêutica inventiva da presente invenção. Em certas modalidades, a administração é repetida. O sujeito pode ser uma criança, jovem, adulto ou idoso. O sujeito pode ainda ser uma criança, jovem, adulto ou idoso imunocomprometido.

[0075] As composições terapêuticas da presente invenção podem ser administradas em uma dose única, ou de acordo com um protocolo de multi-dosagem. Por exemplo, doses relativamente baixas de composição terapêutica são administradas, como uma ou duas doses. Nas modalidades que incluem terapia antibiótica convencional, que geralmente envolve várias doses por um período de dias ou semanas, os antibióticos podem ser tomados uma, duas ou três ou mais vezes diariamente por um período de tempo, como por pelo menos 5 dias, 10 dias ou ainda 14 ou mais dias, enquanto a composição do anticorpo é geralmente administrada uma vez ou duas vezes. No entanto, as diferentes dosagens, tempo de dosagens e quantidades reais de composição terapêutica e antibióticos podem ser selecionados e ajustados por um especialista na técnica.

[0076] As composições para a presente invenção pode ser administradas por meio parenteral, tópico, intravenoso, oral, subcutâneo, intraperitoneal, intranasal ou intramuscular para tratamento profilático e/ou terapêutico. A via de administração mais típica é subcutânea embora outras possam ser igualmente efetivas. A seguinte mais comum é a injeção intramuscular. Este tipo de injeção é mais tipicamente realizado nos músculos do braço ou perna. As injeções intravenosas bem como injeções intraperitoneais, intra-arteriais, intracraniais, ou intradérmicas são ainda efetivas na geração de uma resposta imune.

[0077] Os agentes farmacêuticos da presente invenção podem ser formulados para administração parenteral. As soluções ou suspensões do agente podem ser preparadas em água apropriadamente misturada com um surfactante como hidroxipropilcelulose. As dispersões podem

ainda ser preparadas em glicerol, polietilenoglicos líquidos, e misturas dos mesmos em óleos. Óleos ilustrativos são aqueles de origem de petróleo, animal, vegetal ou sintéticos, por exemplo, óleo de amendoim, óleo de soja ou óleo mineral. Em geral, água, salina, dextrose aquosa e solução de açúcar relacionada e glicos, como propileno glicol ou polietileno glicol, são carreadores líquidos preferenciais, particularmente para soluções injetáveis. Em condições ordinárias de armazenamento e uso, estas preparações contêm um preservativo para prevenir o crescimento de micro-organismos.

[0078] Formulações farmacêuticas apropriadas para uso injetável incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Em todos os casos, a forma deve ser estéril e deve ser fluida à extensão que exista fácil seringabilidade. Deve ser estável nas condições de fabricação e armazenamento e deve ser preservado contra a ação de contaminação de micro-organismos, como bactérias e fungos. O carreador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido), e misturas apropriadas dos mesmos e óleos vegetais.

[0079] Quando é desejável liberar os agentes farmacêuticos da presente invenção sistemicamente, podem ser formulados para administração parenteral por injeção, por exemplo, por injeção em bolus ou infusão contínua. As formulações para injeção podem ser apresentadas sob a forma de dosagem unitária, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de múltiplas doses, com um conservante adicionado. As composições podem tomar formas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes de formulação como agentes de suspensão, estabilização e/ou dispersão.

[0080] Administração intraperitoneal ou intratecal dos agentes da presente invenção podem ainda ser obtidas usando dispositivos de bomba de infusão como aquelas descritas por Medtronic, Northridge, CA. Ditos dispositivos permitem infusão contínua de compostos desejados evitando várias injeções e várias manipulações.

[0081] Além das formulações descritas anteriormente, os agentes podem ainda ser formulados como uma preparação em depósito. Ditas formulações de ação longa podem ser formuladas com materiais poliméricos ou hidrofóbicos apropriados (por exemplo, como uma emulsão em um óleo aceitável) ou resinas de troca iônica, ou como derivados moderadamente solúveis, por exemplo, como um sal moderadamente solúvel.

[0082] Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para prever a gravidade de infecção por *S. aureus*. Este método envolve cultivar *S. aureus* obtido de um sujeito infectado via uma amostra de fluido ou tecido do sujeito e quantificar a expressão de LukE e/ou LukD no *S. aureus* cultivado. As quantidades quantificadas de LukE e/ou LukD na amostra do sujeito são comparadas à quantidade de LukE e/ou LukD em uma amostra controle que produz pouca ou quantidades indetectáveis de LukE e/ou LukD e a gravidade da infecção por *S. aureus* é prevista baseado em dita comparação.

[0083] Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para tratar um sujeito com infecção por *S. aureus*. Este método envolve cultivar *S. aureus* obtido de um sujeito infectado via uma amostra de fluido ou tecido do sujeito e quantificar a expressão de LukE e/ou LukD no *S. aureus* cultivado. As quantidades quantificadas de LukE e/ou LukD na amostra do sujeito são comparadas à quantidade de LukE e/ou LukD em uma amostra controle que produz pouca ou quantidades indetectáveis de LukE e/ou LukD e um tratamento apropriado para o sujeito é determinado baseado nesta comparação. O método

ainda envolve administrar o tratamento apropriado determinado ao sujeito para tratar a infecção por *S. aureus*.

[0084] De acordo com estes aspectos da invenção, quantificar a expressão de LukE e LukD na amostra do sujeito envolve medir o nível de expressão de mRNA de LukE e/ou LukD ou produção de proteína. Os métodos para quantificar mRNA e níveis de expressão de proteína em uma amostra são bem conhecidos na técnica. Um nível aumentado de expressão de mRNA de LukE e/ou LukD ou produção de proteína na amostra do sujeito comparado à amostra controle indica ou prevê que o sujeito tem ou terá uma infecção mais grave por *S. aureus*. Da mesma forma, um nível aumentado de expressão de mRNA de LukE e/ou LukD ou produção de proteína na amostra do sujeito indica que um tratamento apropriado para o sujeito contendo a infecção envolve um ou mais agentes que inibem a citotoxicidade mediada por LukE/D. Agentes apropriados para inibir a citotoxicidade de LukE/D são revelados acima.

[0085] Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para identificar inibidores de citotoxicidade de LukE/D. Este método envolve fornecer uma população de células, uma preparação contendo LukE/D, e um inibidor de LukE/D candidato. A população de célula é exposta à preparação contendo LukE e LukD na presença e ausência do inibidor candidato, e citotoxicidade mediada por LukE/D é medida na presença e na ausência do inibidor candidato. A quantidade medida de citotoxicidade na presença e na ausência do inibidor candidato é comparada e um inibidor de citotoxicidade de LukE/D é identificado baseado nesta comparação.

[0086] De acordo com este aspecto da invenção, anticorpos anti-LukE e anti-LukD, e fragmentos dos mesmos, bem como outras frações terapêuticas potenciais (por exemplo, moléculas orgânicas pequenas) podem ser triadas para avaliar suas capacidades em inibir a

citotoxicidade mediada por LukE/D . Como descrito abaixo, vários métodos foram desenhados para identificar agentes que inibem algum aspecto da cascata de eventos que leva à citotoxicidade mediada por LukE/D e lise de leucócitos humanos. Os métodos são ainda desenhados para identificar formas alteradas de LukE e LukD que possuem toxicidade reduzida em relação às suas contrapartes nativas. Os eventos direcionados que são parte da cascata incluem, por exemplo, a ligação de LukE e/ou LukD às membranas plasmáticas de leucócitos, interação entre LukE e LukD (oligomerização de LukE/D), e bloqueio de poro de membrana formado pelo oligômero LukE/D. Os formatos de ensaio geralmente requerem leucócitos humanos (ou porção de ligação à membrana LukE ou LukD do mesmo), meio de cultura apropriado, e LukE e LukD purificado.

[0087] Um especialista na técnica aprecia que os seguintes protocolos são meramente ilustrativos e que vários parâmetros operacionais como condições de reação, escolha de marcador detectável e equipamentos (por exemplo, instrumentação para detecção e quantificação) podem ser variados como considerados apropriados.

[0088] Os seguintes métodos são geralmente direcionados para identificar agentes que inibem citotoxicidade de LukE/D, sem necessariamente revelar o evento exato na cascata ser afetada.

[0089] Para identificar inibidores de citotoxicidade LukE/D, leucócitos humanos (por exemplo, THP-1) podem ser plaqueados em placas de 384 poços escuras de fundo claro tratadas com cultura de tecido (Corning) a 5×10^3 células/poço em um volume final de 50 μl de RPMI (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado por calor (FBS). As células podem então ser contatadas/misturadas/reagidas/tratadas com o composto/molécula (~5 μl /diferentes concentrações) e então intoxicada com LukE e LukD, que em modalidades preferenciais são substancialmente purificadas (5 μl de uma solução ~0,01-5 μM), prefe-

rencialemente adicionados juntos, em condições de cultura para permitir intoxicação dos leucócitos por LukE e LukD, por exemplo, por 1 hora a 37°C, 5% CO₂. Como controles, as células podem ser tratadas com meio de cultura (100% viável) e com 0,1% v/v Triton X100 (100% de morte).

[0090] Nestas modalidades, as células tratadas como descrito acima podem então ser incubadas com um corante para monitorar a viabilidade celular como CellTiter (Promega) (que permite a determinação de viabilidade celular via absorbância medindo-se o número de células viáveis em um cultura por quantificação da atividade metabólica das células) e incubadas por um período de tempo adicional (por exemplo, cerca de 2 horas a 37°C, 5% CO₂). A viabilidade célula pode então ser determinada medindo-se a reação colorimétrica a 492nm usando um leitor de placa, Envision 2103 Multi-label Reader (Perkin-Elmer). O percentual de células viáveis pode ser calculado como usando-se a seguinte equação: % Viabilidade = 100 x [(Ab₄₉₂Amostra - Ab₄₉₂TritonX) / (Ab₄₉₂Meio de cultura de tecido)]. Um aumento na viabilidade 100% sugere a inibição de citotoxicidade mediada por LukE/D.

[0091] Uma variação deste ensaio é referenciada como um ensaio de dano de membrana. Nestas modalidades, as células tratadas como descrito acima (por exemplo, até e incluindo tratamento das células com composto/molécula teste e então intoxicando as células com LukE e LukD purificadas), podem então ser incubadas com um corante fluorescente impermeável à célula como SYTOX verde (0,1 µM; Invitrogen) (de acordo com as instruções do fabricante) e incubadas, por exemplo, por mais 15 minutos adicionais em temperatura ambiente no escuro. Fluorescência, como um indicador de dano de membrana, pode então ser medido usando um leitor de placa como Envision 2103 Multilabel Reader (Perkin-Elmer) em excitação 485nm, emissão 535nm. Uma redução em fluorescência sugere inibição de citotoxicidade de LukE/D.

[0092] Em outra variação deste ensaio, as células tratadas como descrito acima (por exemplo, até e incluindo tratamento das células com o composto teste e então intoxicando as células com LukE e LukD purificadas), podem então ser incubadas com um marcador de lise de célula e incubadas por um período de tempo adicional em temperatura ambiente no escuro. O marcador de lise celular é medido, e uma redução no nível de lise celular na presença do composto indica inibição de citotoxicidade de LukE/D.

[0093] Juntos estes ensaios irão facilitar a identificação de compostos que inibem ou reduzem os efeitos citotóxicos de LukE/D para as células de leucócitos.

[0094] Métodos adicionais podem ser usados, independentemente ou em conjunto com os métodos descritos acima, particularmente se os métodos acima relevam atividade inibitória, que irá permitir que um especialista na técnica determine mais precisamente qual evento na cascata bioquímica está sendo afetado ou direcionado pelo agente. Estes eventos incluem ligação de LukE e/ou LukD às membranas de leucócitos, ligação de LukE a LukD (oligomerização LukE/D), e bloqueio do poro de membrana formado pelos oligômeros LukE/D.

[0095] Outro aspecto da presente invenção é direcionado à um método para identificar inibidores de ligação de LukE, LukD e/ou LukE/D. Este método envolve fornecer uma população de leucócitos ou outras células alvo, uma preparação contendo um LukE, LukD, ou LukE/D detectavelmente marcado, e um inibidor candidato. A população de célula é exposta à preparação contendo o LukE e LukD ou LukE/D detectavelmente marcado na presença e ausência do inibidor candidato, e ligação de LukE e/ou LukD ou LukE/D marcado à população de leucócito é medida na presença e ausência do inibidor candidato. A quantidade medida de ligação de LukE, LukD, ou LukE/D na presença e na ausência do inibidor candidato é comparada e um inibidor

de ligação de LukE, LukD, ou LukE/D ao leucócito é identificada com base nesta comparação.

[0096] Para triar inibidores que bloqueiam ou reduzem ligação de LukE, LukD ou LukE/D às células alvo, que é a primeira etapa no processo de intoxicação, leucócitos humanos (por exemplo, células THP-1) podem ser plaqueados em placas de 384 poços de fundo plano tratadas com cultura de tecido (Corning) a $2,5 \times 10^3$ células/poço em um volume final de 50 µl de RPMI (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (FBS). As células podem então ser tratadas com o composto/molécula teste (~5 µl/diferentes concentrações) e incubadas com LukE, LukD e/ou LukE/D purificados, fluorescentemente marcados (por exemplo, FITC, Cy3, Cy5, APC, PE) 5 µl de uma solução ~0,01-5 solution por 1 hora a 4°C, 5% CO₂. Para avaliar a eficácia dos compostos/moléculas testados, a fluorescência associada à célula pode ser medida como um indicador de ligação de LukE, LukD, ou LukE/D às células, por exemplo, usando um sistema de geração de imagem microscópica de fluorescência automatizado para triagem em alto teor e análise de alto teor (por exemplo, Cellomics ArrayScan HCS Reader (Thermo Scientific) (excitação 485nm, emissão 535nm)). De acordo com este aspecto da invenção, uma redução em ligação de LukE, LukD, ou LukE/D ao leucócito na presença do inibidor candidato comparada à sua ausência identifica um inibidor de ligação.

[0097] Para triar inibidores que bloqueiam ou reduzem a interação de LukE/LukD, que é a segunda etapa no processo de intoxicação, leucócitos humanos (por exemplo, células THP-1) podem ser plaqueados em placas de 384 poços de fundo plano tratadas com cultura de tecido (Corning) a $2,5 \times 10^3$ células/poço em um volume final de 50 µl de RPMI (Gibco) complementado com 10% de soro bovino fetal inativado por calor (FBS). As células podem então ser tratadas com o composto/molécula teste e então intoxicadas com uma mistura de LukE e

LukD purificadas onde LukD é fluorescentemente marcada com uma molécula fluorescente como FITC, Cy3, Cy5, APC, e PE, e deixadas em repouso para completar o processo de intoxicação (por exemplo, por 1 hora a 37°C, 5% CO₂). Para avaliar a eficácia dos compostos/moléculas testados, fluorescência de LukD-FITC associada à célula pode ser medida como um indicador de interação de LukE/LukD-FITC, usando, por exemplo, um sistema de imagem microscópica de fluorescência automatizado desenhado para triagem de alto teor e análise de alto teor (por exemplo, a Cellomics ArrayScan HCS Reader (Thermo Scientific) (Excitação 485nm, Emissão 535nm). Experimentos semelhantes poderiam ser realizados usando LukE fluorescentemente marcada em vez de LukD.

[0098] Outro aspecto da presente invenção refere-se a um método para identificar inibidores de formação de poro mediada por LukE/D. Este método envolve fornecer uma população de leucócitos, uma preparação contendo LukE e LukD, e um inibidor candidato. A população de leucócito é exposta à preparação contendo LukE e LukD na presença e ausência do inibidor candidato, e a formação do poro na população de leucócito é medida na presença e ausência do inibidor candidato. A quantidade medida de formação de poro na presença e na ausência do inibidor candidato é comparada e um inibidor de formação de poro mediada por LukE/D é identificada baseado naquela comparação.

[0099] Para triar inibidores que bloqueiam ou inibem a formação de poro LukE/D, a molécula efetora que leva à lise de célula, leucócitos humanos (por exemplo, células THP-1) podem ser plaqueadas em uma placa de 384 poços escura de fundo claro tratada com cultura de tecido (Corning) a 2,5 x 10³ células/poço em um volume final de 50 µl de RPMI (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado por calor (FBS). As células podem então ser tratadas com o com-

posto/molécula teste (~5 µl contendo diferentes concentrações) e então intoxicadas com LukE e LukD ou LukE/D purificadas (~0,01-5 µM) por 15 minutos a 37°C, 5% CO₂. Como controles, as células podem ser tratadas com meio de cultura (controle negativo) e com 0,1% v/v TritonX100 (controle positivo).

[00100] Para diretamente avaliar os poros LukE/D na superfície de células hospedeiras, um ensaio de influxo de brometo de etídio (EB) podem ser usadas. EB é um corante catiônico pequeno que é impermeável às células hospedeiras saudáveis. Na formação de poros catiônicos por LukE/D, EB entra nas células e se liga a DNA, que resulta em fluorescência. A célula tratada deste modo pode então ser incubada com EB (5 µM) por mais 5 minutos em temperatura ambiente no escuro. Para avaliar a eficácia dos compostos/moléculas testados na inibição de formação de poro por LukE/D a fluorescência pode ser medida como um indicador de formação de poro usando um leitor de placa como Envision 2103 Multilabel Reader (Perkin-Elmer) em Excitação 530nm, Emissão 590nm. Este ensaio irá facilitar a identificação de moléculas que podem bloquear ou inibir o poro por LukE/D, que irá aliviar a toxicidade mediada por LukE/D.

[00101] Para diretamente avaliar os poros LukE/D na superfície de células hospedeiras, um ensaio de influxo de brometo de etídio (EB) podem ser usadas. EB é um corante catiônico pequeno que é impermeável em células hospedeiras saudáveis. Na formação de poros catiônicos por LukE/D, EB entra nas células e se liga a DNA, que resulta em fluorescência (ver, por exemplo, Figura 5E). As células tratadas com um agente que gera a formação de poro por LukE/D podem então ser incubadas com EB (5 µM) por mais 5 minutos em temperatura ambiente no escuro. Para avaliar a eficácia dos compostos/moléculas testados na inibição de formação de poro por LukE/D a fluorescência pode ser medida como um indicador de formação de poro usando um leitor

de placa como Envision 2103 Multilabel Reader (Perkin-Elmer) em Exitação 530nm, Emissão 590nm. Este ensaio irá facilitar a identificação de moléculas que podem bloquear ou inibir o poro por LukE/D, que irá aliviar a toxicidade mediada por LukE/D.

[00102] Os compostos candidatos utilizados nestes ensaios descritos aqui podem ser essencialmente qualquer composto ou composição suspeito de serem capazes de afetar as funções ou interações biológicas. O composto ou composição pode ser parte de uma biblioteca de compostos ou composições. Alternativamente, o composto ou composições podem ser desenhados especificamente para interagir ou interferir com a atividade biológica de LukE, LukD, ou LukE/D da presente invenção.

EXEMPLOS

[00103] Os seguintes exemplos são fornecidos para ilustrar as modalidades da presente invenção, mas não pretendem limitar seu escopo.

Exemplo 1 - Inativação de *rot* melhora a virulência de uma cepa de *S. aureus* desprovida de *agr*.

[00104] Em estudos recentes foi demonstrado que cepa mutante de *S. aureus* que é desprovida de regulador máster conhecido como o regulador do gene acessório ("Agr") e o repressor de fator de transcrição de toxinas ("Rot") (ou seja, $\Delta agr \Delta rot$) apresenta virulência melhorada em um modelo murino de infecção sistêmica comparada ao mutante Δagr altamente atenuado. Enquanto um mutante de deleção única Δagr é altamente atenuado para virulência como medido por sobrevida ao longo do tempo após a infecção, um mutante duplo $\Delta agr \Delta rot$ apresenta características de virulência semelhantes à da cepa parental (WT Newman) (Figura 1A). Foi especulado que a virulência aumentada observada na mutante dupla $\Delta agr \Delta rot$ poderia ser devido à expressão aumentada de leucotoxinas de *S. aureus* conforme acredita-se

que estas toxinas são reguladas em um modo dependente de Agr-Rot. De fato, análise de imunoblot das toxinas produzidas por *S. aureus* tipo selvagem, cepas mutantes Δagr , e $\Delta agr \Delta rot$ confirmaram a hipótese conforme o número de toxinas foram restabelecidas aos níveis de WT em uma mutante dupla $\Delta agr \Delta rot$ (Figura 1B). Surpreendentemente, foi observado que LukE/D é altamente super produzida pela cepa $\Delta agr \Delta rot$ comparados às outras toxinas (Figura 1B). Estes dados demonstram que a repressão de fatores de virulência importantes por Rot é crítico para o potencial de virulência ideal em *S. aureus* e que a leucotoxina LukE/D é pesadamente reprimida em um modo dependente de Rot, mais do que outras leucotoxinas.

Exemplo 2 - LukE/D contribui para a virulência aumentada apresentada por uma cepa de *S. aureus* desprovida de *rot*

[00105] Os resultados descritos nas Figuras 1A-1B indicaram que a inativação *rot* em uma cepa *agr⁺* poderia ainda resultar em virulência aumentada, possivelmente em um modo dependente de LukE/D. Como com a mutante dupla $\Delta agr \Delta rot$ (Figura 1A), foi observado que uma mutante de deleção simples Δrot ainda resultou em virulência aumentada em um modelo murino de infecção sistêmica, como evidenciado pela redução em sobrevida percentual de animais infectados com Δrot comparado aos infectados com WT (Figura 2A). Observações mais precoces demonstraram que Rot é possivelmente um repressor principal de leucotoxina LukE/D. Para confirmar estes achados no contexto da mutante de deleção única Δrot , imunoblot foram realizados. Estes experimentos revelaram que de fato LukE/D é altamente produzido na ausência de *rot*, contrário a LukAB, γ -hemolisina (HlgC), ou α -toxina (Hla; Figura 2B). Estes achados ainda reforça a hipótese que LukE/D é o principal fator reprimido por Rot responsável pelo aumento na virulência de uma mutante Δrot e que LukE/D poderia desempenhar um papel significativo na patogênese *in vivo* de *S. aureus*. Para determinar

se a super produção de LukE/D foi responsável pelo fenótipo patogênico melhorado de Δrot , uma mutante dupla $\Delta rot \Delta lukE/D$ foi construída e sua virulência em um modelo de camundongo de infecção foi avaliada. A mutante dupla $\Delta rot \Delta lukE/D$ foi significativamente comprometida para virulência como evidenciado pela redução surpreendente em mortalidade comparada a ambos WT bem como mutante Δrot (Figura 2C). Estes resultados demonstram que LukE/D é um fator principal reprimido por Rot que é crítico para a hipervirulência associada com uma mutante Δrot e que LukE/D pode ser um contribuinte principal para a doença em geral. Estes dados ainda indicam que as drogas que aumenta a repressão mediada por Rot de genes alvos irá reduzir patogênese *S. aureus*.

Exemplo 3 - Rot reprime a expressão de LukE/D por ligação direta ao promotor de LukE/D

[00106] Para ainda avaliar a influência de Rot em expressão do gene *lukE/D*, fusões transcricionais de região promotora de *lukE/D* à um gene que codifica para a proteína fluorescente verde (GFP) foram construídos e a fluorescência foi medida ao longo do tempo em caldo de cultura usando cepas WT, Δagr , Δrot , e $\Delta agr \Delta rot$. Como suspeito, a expressão do gene de *lukE/D* foi aumentada acima que o WT em cepas desprovidas de Rot, enquanto cepas expressando grandes quantidades de Rot (mutantes Δagr apresentam níveis aumentados de Rot) foram reduzidos na expressão. Para avaliar se a repressão de *lukE/D* por Rot é direta, a capacidade de Rot em se ligar ao promotor *lukE/D* foi avaliada usando uma estratégia de promotor pull-down. Os lisados totais bacterianos foram incubados com DNA promotor *lukE/D* ou ligação de DNA intergênico não específico às esferas magnéticas. Imuno-blot de proteínas ligadas demonstrou que Rot de fato se liga ao promotor *lukE/D* de um modo específico (Figura 3B). Estes resultados implicam que Rot é um repressor direto de expressão de gene *lukE/D*. As

alterações nos níveis de Rot poderia, assim, substancialmente aumentar ou reduzir a produção de LukE/D e por consequência modular a virulência potencial de *S. aureus*.

Exemplo 4 - LukE/D Significativamente Contribui para a patogênese de *S. aureus*

[00107] Não somente uma mutação de deleção dupla $\Delta\text{rot } \Delta\text{lukE/D}$ elimina a hipervirulência associada com uma deleção rot, ainda substancialmente reduz a virulência geral (comparado sobrevida de WT com a sobrevida de $\Delta\text{rot } \Delta\text{lukE/D}$ Figura 3B). Para testar se LukE/D desempenha um papel principal na patogênese de infecção por septicemia de *S. aureus*, um mutante $\Delta\text{lukE/D}$ na cepa Newman foi construído (Figuras 4A e 4B) e o impacto de deleção *lukE/D* isolado na virulência foi avaliado. A sobrevida ao longo do tempo drasticamente aumentada para camundongos infectados com 10^7 ou 10^8 CFU de mutante $\Delta\text{lukE/D}$ comparado ao tipo selvagem. Todos os camundongos tipo selvagem sucumbiram à infecção em 250 horas na dose 10^7 (Figura 4C) e em 100 horas na dose 10^8 (Figura 4D). Em ambos os casos, no entanto, quase 100% dos camundongos infectados com mutante $\Delta\text{lukE/D}$ sobreviveram até pelo menos 300 horas após a infecção, um fenótipo que é totalmente complementado com a cepa $\Delta\text{lukE/D}::\text{plukE/D}$ (Figuras 4B e 4C). Além disso, a carga bacteriana ao rim é reduzida em 10 vezes comparado ao tipo selvagem ou cepas complementadas (Figura 4E) e formação de abscesso é significativamente reduzida (Figura 4F). Estes resultados mostram que LukE/D é de fato um fator de virulência infecção sistêmica por *S. aureus*. Assim, LukE/D é um novo alvo de atração para o desenvolvimento de novas terapias para conter a infecção por *S. aureus*.

Exemplo 5 - LukE/D direciona e mata leucócitos

[00108] Para determinar o mecanismo de ação potencial de LukE/D, proteínas LukE e LukD recombinantes de *E. coli* foram expressas e puri-

ficadas. Para testar a toxicidade potencial destas proteínas, células tipo monócitos humanos (THP-1s) e células de leucemia promielocíticas humanas (HL60s) foram incubadas com diferentes concentrações de subunidades individuais (ou seja, LukE ou LukD) ou uma mistura de LukE+LukD (LukE/D). As células foram intoxicadas com uma dose resposta de LukE isolado, LukD isolado, ou LukE/D e após 1 hora de intoxicação CellTiter foi adicionado para medir o percentual de células viáveis após a intoxicação. A linhagem celular tipo monócitos humanos, THP-1, foi unicamente sensível à intoxicação com ambas subunidades da toxina juntas, mas não subunidades individuais. A potência da toxina na direção das células foi dependente da dose e estritamente requereu a presença de ambas as subunidades (Figura 5A). Em contraste, HL60s não foram afetadas por subunidade isolada ou incubadas juntas (Figura 5B). Além das linhagens celulares, a atividade de LukE/D para PMNs primárias humanas e murinas foi ainda avaliada. As células foram intoxicadas com uma dose resposta de LukE isolado, LukD isolado, ou LukE/D e após 1 hora de intoxicação CellTiter foi adicionado para medir o percentual de células viáveis após a intoxicação. LukE/D, mas não LukE ou LukD foi marcadamente citotóxico para PMNs de humanos e de camundongos (Figura 5C).

[00109] Para avaliar o mecanismo pelo qual LukE/D é tóxico à THP-1s, as células foram intoxicadas na presença de brometo de etídio, um pequeno corante catiônico que é normalmente impermeável às membranas da célula hospedeira, mas pode ganhar acesso à célula através do poro da toxina. Na adição de ambas subunidades de toxina, brometo de etídio foi rapidamente tomado nas células como refletido por um aumento na fluorescência realtiva comparada aos controles não intoxicados PMN-HL60s intoxicados (Figuras 5D e 5E). Estes experimentos demonstram que quando juntos, LukE e LukD apresentam citotoxicidade para tipo de célula imune humana específica, mas não

outras, destacando a especificidade da toxina.

Exemplo 6 - Anticorpos contra LukE potencialmente neutralizaram cito-toxicidade de LukE/D

[00110] Para determinar se os anticorpos policlonais elevados contra LukE são capazes de neutralizar a citotoxicidade de LukE/D, um ensaio de neutralização foi realizado. A incubação de LukE/D com anticorpos anti-LukE purificados potencialmente inibiu a citotoxicidade mediada por LukE/D para células THP-1 como medido por CellTiter (Figura 6A). Como mostrado nas Figuras 5A-5E, LukE/D parece exercer sua atividade tóxica formando poros permeáveis na membrana plasmática de células alvo. Para ganhar insight no mecanismo pelo qual anti-LukE neutraliza citotoxicidade de LukE/D, a formação de poros por LukE/D em células intoxicadas com LukE/D na presença de anticorpos anti-LukE purificados foi monitorada. Foi observado que a formação de poro LukE/D foi potencialmente inibida por anticorpo anti-LukE (Figura 6B). Estes dados demonstram que a imunização com LukE gera anticorpos neutralizantes anti-LukE, sugerindo que anticorpos específicos para LukE poderiam ser uma nova terapêutica para combater a infecção por *S. aureus*.

[00111] Embora a invenção tenha sido descrita em detalhes para a finalidade de ilustração, é entendido que ditos detalhes são unicamente para essa finalidade e variações podem ser realizadas na mesma pelos especialistas na técnica sem se afastar do espírito e escopo da invenção que é definido pelas seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para imunização de um indivíduo contra uma infecção por *Staphylococcus aureus*, caracterizada pelo fato de que compreende

(i) um fragmento de um polipeptídeo imunogênico Leucocidina E (LukE) de SEQ ID NO: 11 isolado, em que o referido fragmento de LukE possui de 50-200 aminoácidos de comprimento,

(ii) um fragmento de um polipeptídeo imunogênico Leucocidina D (LukD) de SEQ ID NO:22 isolado, em que o referido fragmento de LukD possui de 50-200 aminoácidos de comprimento, ou

(iii) uma combinação uma combinação de (i) e (ii); em que o fragmento de polipeptídeo LukE e/ou LukD isolado está presente na composição em uma quantidade eficaz para gerar uma resposta imune contra *S. aureus* em um indivíduo.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo isolado da composição está ligado a uma molécula transportadora imunogênica.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a molécula transportadora imunogênica é covalentemente ou não covalentemente ligada ao polipeptídeo isolado.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a molécula transportadora imunogênica é selecionada dentre o grupo consistindo em albumina de soro bovino, ovalbumina de ovo de galinha, hemocianina de keyhole limpet, toxoide tetânico, toxoides de difteria, tiroglobulina, um polissacarídeo capsular pneumocócico, CRM 197 e uma proteína de membrana externa meningocócica.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um ou mais antígenos de *S. aureus* adicionais selecionados dentre o grupo consistindo em um an-

tígeno de alfa hemolisina, proteína A, um antígeno de polissacarídeo sorotipo 336, coagulase, fator aglutinante A, fator aglutinante B, uma proteína de ligação a fibronectina, uma proteína de ligação a fibrinogênio, uma proteína de ligação a colágeno, uma proteína de ligação a elastina, uma proteína análoga de MHC, uma adesão intracelular de polissacarídeo, beta hemolisina, delta hemolisina, gama hemolisina, leucocidina de Panton-Valentine, leucocidina A, leucocidina B, leucocidina M, toxina esfoliativa A, toxina esfoliativa B, protease V8, hialuronatoliase, lipase, estafilocinase, uma enterotoxina, toxina da síndrome de choque tóxico 1, poli-N-succinil beta-1→6 glicosamina, catalase, beta-lactamase, ácido teicoico, peptidoglicano, uma proteína de ligação a penicilina, proteína de inibição de quimiotaxia, inibidor de complemento, Sbi, antígeno Tipo 5, antígeno Tipo 8, ácido lipoteicoico e moléculas hospedeiras reconhecendo componentes de superfície microbiana.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um adjuvante.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o adjuvante é selecionado dentre o grupo consistindo em flagelina, adjuvante completo de Freund, adjuvante incompleto de Freund, hidróxido de alumínio, lisolecitina, polioisplurônicos, polianions, peptídeos, emulsão de óleo, dinitrofenol, iscomatriz e partículas de DNA de lipossoma.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo LukE isolado tem 50-100 resíduos de aminoácidos de comprimento.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo LukD isolado tem 50-100 resíduos de aminoácidos de comprimento.

10. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracte-

rizada pelo fato de que o polipeptídeo LukE isolado tem 100-200 resíduos de aminoácidos de comprimento.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o polipeptídeo LukD isolado tem 100-200 resíduos de aminoácidos de comprimento.

12. Uso de uma composição, como definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para imunizar contra uma infecção por *Staphylococcus aureus*.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um ou mais antígenos de *S. aureus* adicionais selecionados dentre o grupo consistindo em um antígeno de alfa hemolisina, proteína A, um antígeno de polissacárido sorotipo 336, coagulase, fator aglutinante A, fator aglutinante B, uma proteína de ligação a fibronectina, uma proteína de ligação a fibrinogênio, uma proteína de ligação a colágeno, uma proteína de ligação a elastina, uma proteína análoga de MHC, uma adesão intracelular de polissacárido, beta hemolisina, delta hemolisina, gama hemolisina, leucocidina de Panton-Valentine, leucocidina A, leucocidina B, leucocidina M, toxina esfoliativa A, toxina esfoliativa B, protease V8, hialuronatolise, lipase, estafilocinase, uma enterotoxina, toxina da síndrome de choque tóxico 1, poli-N-succinil beta-1→6 glicosamina, catalase, beta-lactamase, ácido teicoico, peptidoglicano, uma proteína de ligação a penicilina, proteína de inibição de quimiotaxia, inibidor de complemento, Sbi, antígeno Tipo 5, antígeno Tipo 8, ácido lipoteicoico e moléculas hospedeiras reconhecendo componentes de superfície microbiana.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a composição compreende ainda um adjuvante.

15. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado

pelo fato de que um adjuvante é para ser administrado ao indivíduo antes, depois ou em simultâneo com a administração da composição como definida na reivindicação 1.

16. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a administração da composição induz uma resposta de anticorpos neutralizante contra *S. aureus* no indivíduo.

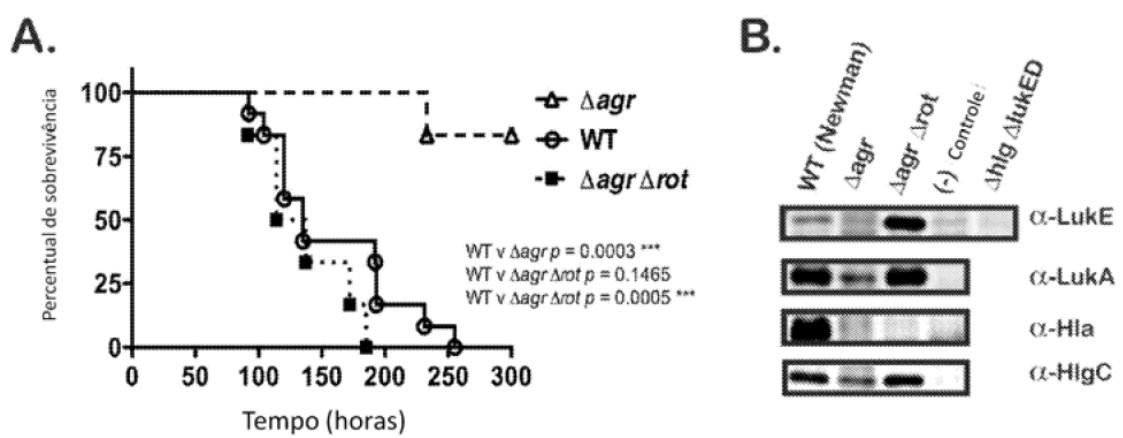
17. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a infecção por *S. aureus* é uma infecção por *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) ou uma infecção por *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA).

18. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o medicamento é para ser administrado de forma oral, por inalação, por instilação intranasal, tópica, transdérmica, parenteral, subcutânea, por injeção intravenosa, por injeção intra-arterial, por injeção intramuscular, intraplural, intraperitoneal ou por aplicação a uma membrana de mucosa.

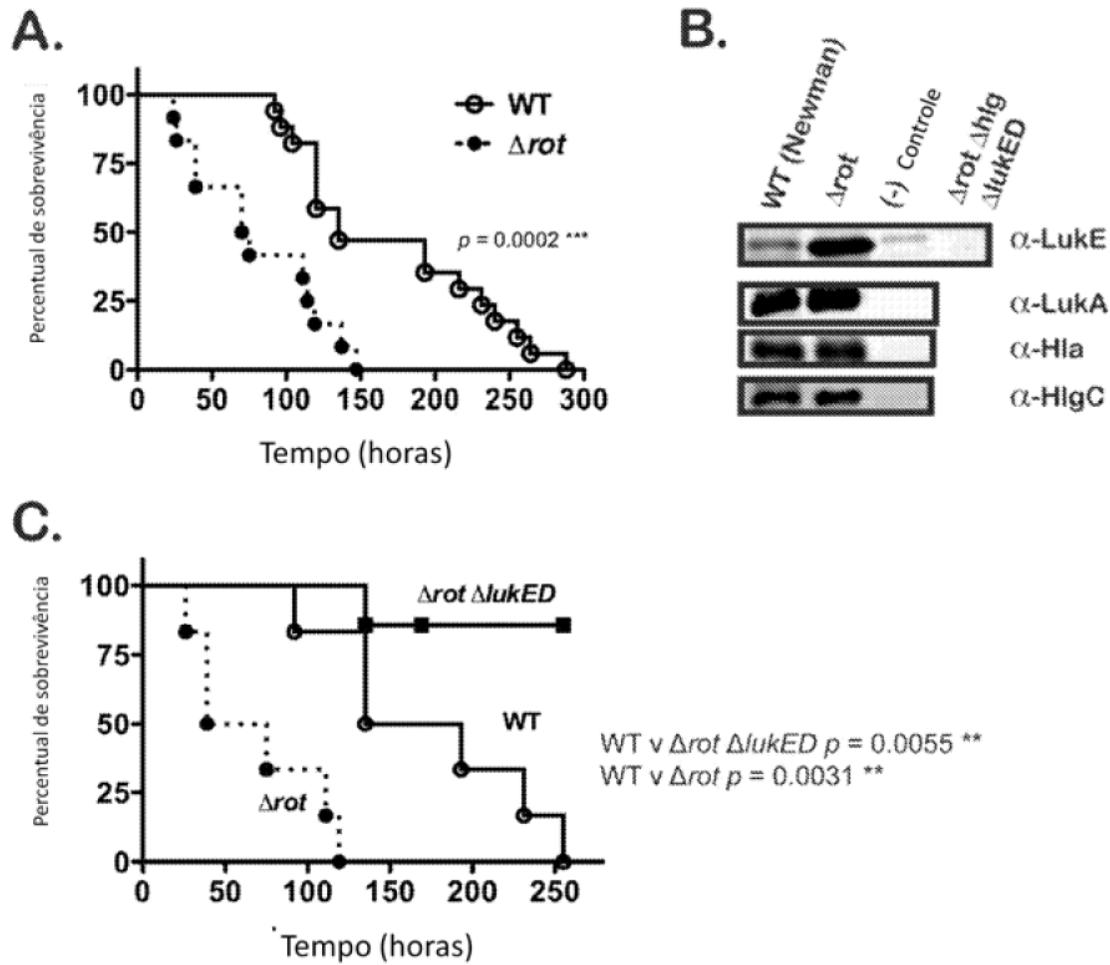
19. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o medicamento é para ser administrado de maneira repetida.

20. Uso de acordo com reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um bebê, jovem, adulto ou adulto idoso.

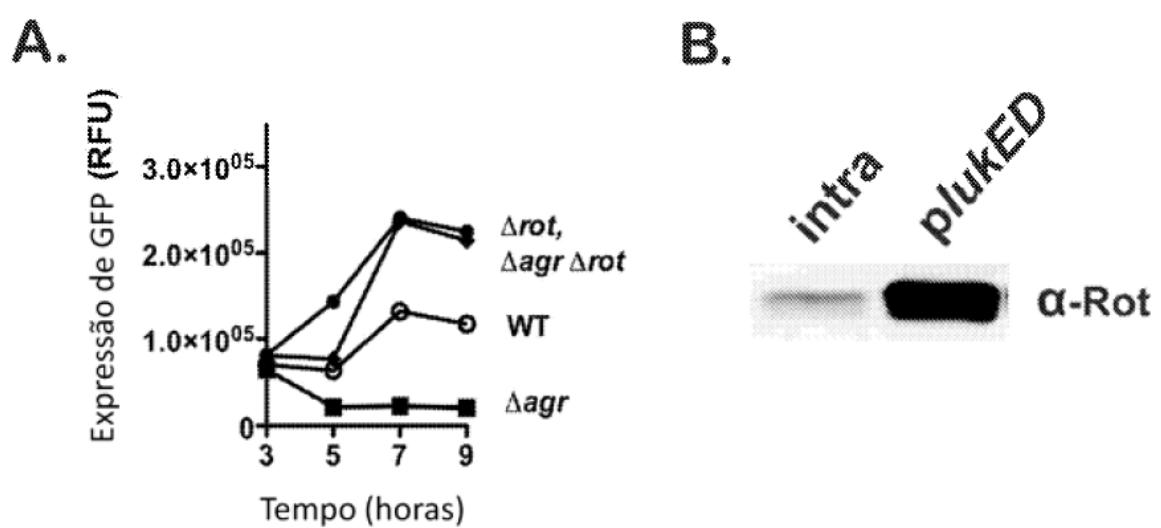
21. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um jovem, um adulto ou um adulto idoso imunocomprometido.



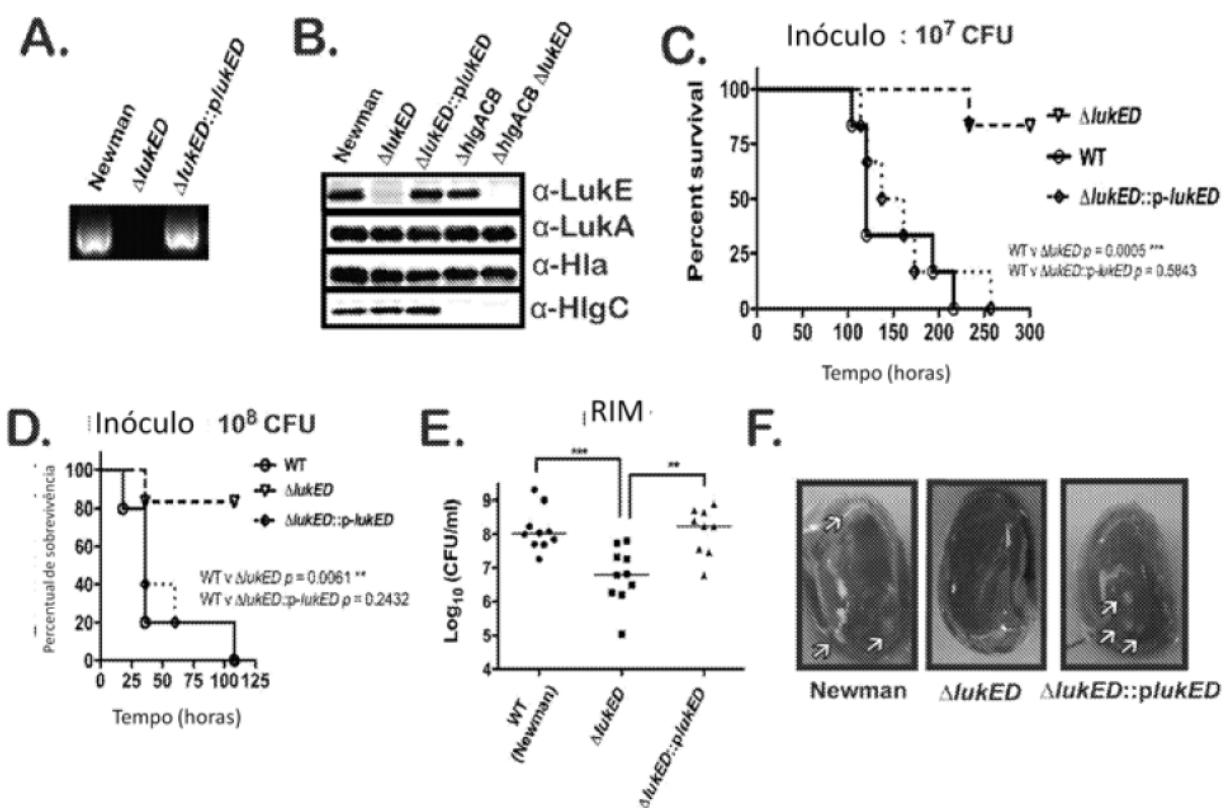
FIGURAS 1A-1B



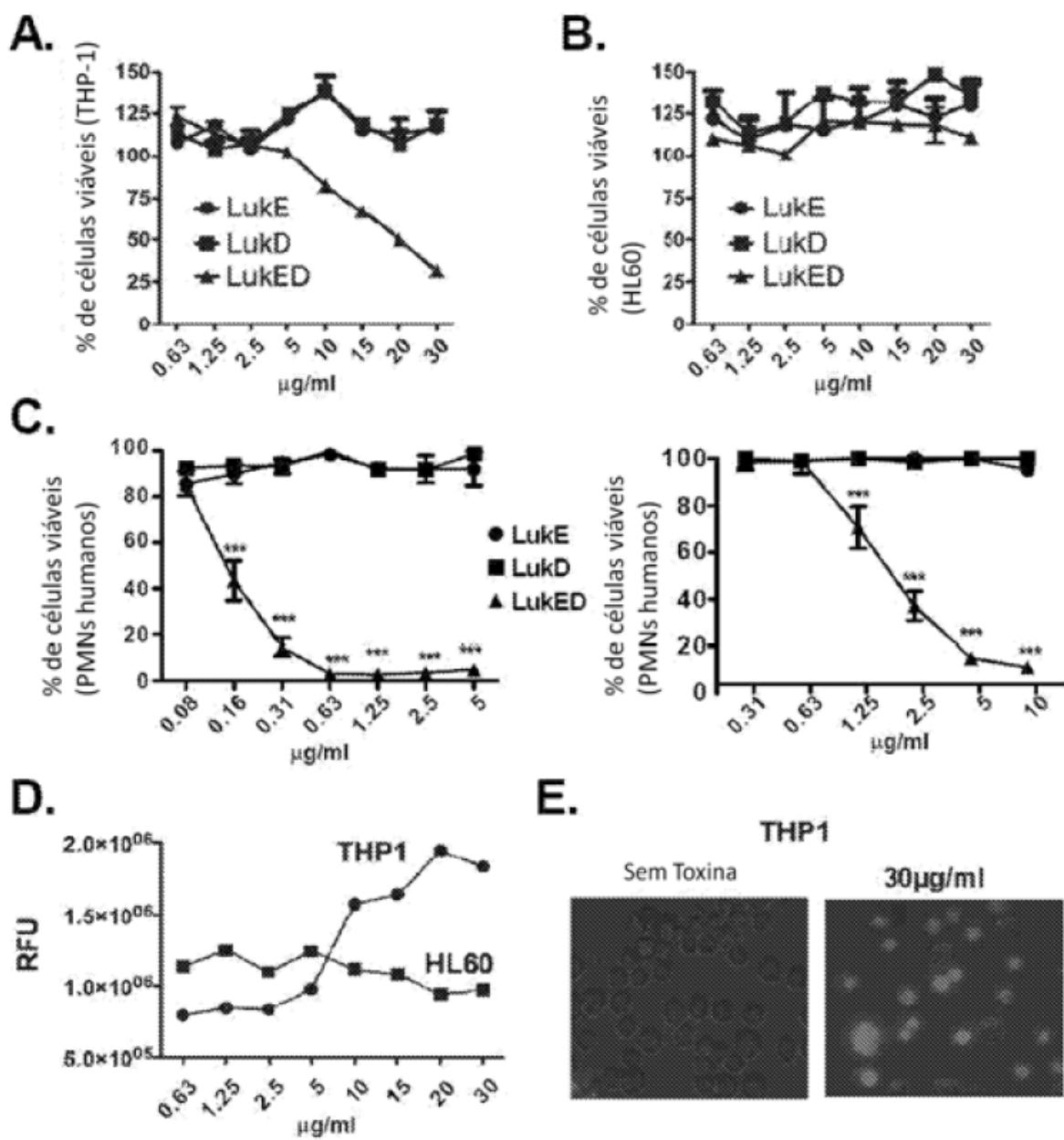
FIGURAS 2A-2B



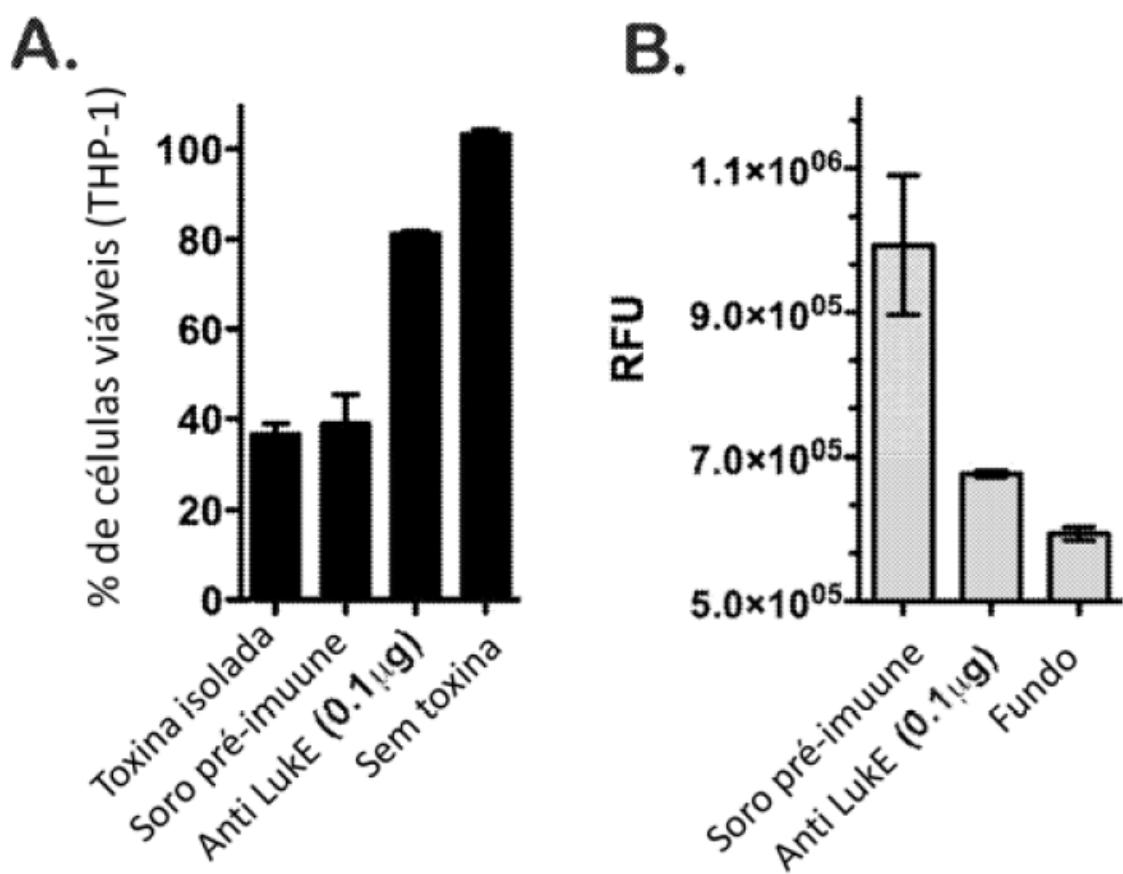
FIGURAS 3A-3B



FIGURAS 4A-4F



FIGURAS 5A-5E



FIGURAS 6A-6B