

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 646**

51 Int. Cl.:

C07K 14/31 (2006.01)

A61K 39/085 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2010** **E 10797468 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015** **EP 2414387**

54 Título: **Composiciones y métodos relacionados con variantes de la proteína A (SpA)**

30 Prioridad:

18.12.2009 US 287996 P

03.04.2009 US 166432 P

28.08.2009 US 237956 P

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

15.03.2016

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF CHICAGO (100.0%)

5801 S. Ellis Avenue

Chicago, IL 60637, US

72 Inventor/es:

SCHNEEWIND, OLAF;

CHENG, ALICE;

MISSIAKAS, DOMINIQUE y

KIM, HWAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 563 646 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos relacionados con variantes de la proteína A (SpA)

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

I. ÁREA DE LA INVENCION

- 5 La presente invención hace referencia en general a las áreas de inmunología, microbiología, y patología. Más en particular, hace referencia a métodos y composiciones que implican variantes de la proteína A bacteriana, que pueden utilizarse para provocar una respuesta inmune contra las bacterias.

II. ANTECEDENTES

- 10 El número de infecciones tanto extrahospitalarias como intrahospitalarias ha aumentado en los últimos años con el aumento del uso de dispositivos intravasculares. Las infecciones intrahospitalarias (nosocomiales) causan una gran morbilidad y mortalidad, más concretamente en los Estados Unidos, donde afecta a más de 2 millones de pacientes anualmente. Las infecciones más frecuentes son infecciones del tracto urinario (un 33% de las infecciones), seguido de neumonía (un 15,5%), infecciones de sitio quirúrgico (un 14,8%) e infecciones primarias del torrente sanguíneo (un 13%) (Emori and Gaynes, 1993).

- 15 Entre los patógenos nosocomiales más importantes se incluyen el *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulasa negativos (principalmente *Staphylococcus epidermidis*), *enterococcus* spp., *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Aunque estos patógenos causan aproximadamente el mismo número de infecciones, la gravedad de los trastornos que producen en combinación con la frecuencia de aislados resistentes a antibióticos, nivelan esta clasificación hacia el *S. aureus* y el *S. epidermidis* como los patógenos nosocomiales más significativos.

- 20 Los estafilococos pueden causar una variedad de enfermedades en humanos y otros animales ya sea a través de la producción o bien la invasión de toxinas. Las toxinas estafilocócicas son también una causa común de intoxicación por alimentos, ya que las bacterias pueden crecer en alimentos almacenados de forma no apropiada.

- 25 El *Staphylococcus epidermidis* es un comensal habitual de la piel que es además un importante patógeno oportunista responsable de infecciones de dispositivos médicos defectuosos e infecciones en los sitios quirúrgicos. Los dispositivos médicos infectados por el *S. epidermidis* incluyen estimuladores cardíacos, shunt o derivación del líquido cefalorraquídeo, catéteres para diálisis peritoneal ambulatoria continua, dispositivos ortopédicos y válvulas cardíacas protésicas.

- 30 El *Staphylococcus aureus* es la causa más común de las infecciones nosocomiales con una morbilidad y mortalidad significativas. Es la causa de algunos casos de osteomielitis, endocarditis, artritis séptica, neumonía, abscesos, y síndrome de shock tóxico. El *S. aureus* puede sobrevivir en superficies secas, lo que aumenta la posibilidad de transmisión. Cualquier infección por *S. aureus* puede causar el síndrome estafilocócico de la piel escaldada, una reacción cutánea a la exotoxina absorbida en el torrente sanguíneo. También puede causar un tipo de septicemia llamada piemia que puede suponer un peligro para la vida. Problemáticamente, el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) se ha convertido en la principal causa de infecciones intrahospitalarias.

- 35 Las infecciones por *S. aureus* y *S. epidermidis* se tratan habitualmente con antibióticos, siendo la penicilina el fármaco por excelencia, mientras que la vancomicina se utiliza para los aislados resistentes a meticilina. El porcentaje de cepas estafilocócicas que muestran una resistencia de amplio espectro a los antibióticos, se ha vuelto cada vez más frecuente, lo que representa una amenaza para una terapia antimicrobiana efectiva. Además, la reciente aparición de una cepa de *S. aureus* resistente a la vancomicina ha suscitado el temor de que están surgiendo y extendiéndose cepas de SARM para las que no existe disponibilidad de ninguna terapia efectiva.

- 40 Se encuentra en investigación una alternativa al tratamiento con antibióticos para las infecciones estafilocócicas que utiliza anticuerpos dirigidos contra antígenos estafilocócicos. Esta terapia implica la administración de antisero policlonal (WO00/15238, WO00/12132) o tratamiento con anticuerpos monoclonales contra el ácido lipoteicoico (WO98/57994).

- 45 Una aproximación alternativa sería el uso de una vacuna activa para generar una respuesta inmune contra los estafilococos. El genoma del *S. aureus* se ha secuenciado y muchas de las secuencias de codificación se han identificado (WO02/094868, EP0786519), que conducen a la identificación de antígenos potenciales. Lo mismo ocurre para el *S. epidermidis* (WO01/34809). Como refinamiento de esta aproximación, otros investigadores han identificado proteínas que son reconocidas por suero hiperinmune procedente de pacientes que han sufrido una infección por estafilococos (WO01/98499, WO02/059148).

El *S. aureus* secreta una plétora de factores de virulencia en medio extracelular (Archer, 1998; Dinges *et al.*, 2000; Foster, 2005; Shaw *et al.*, 2004; Sibbald *et al.*, 2006). Como la mayoría de las proteínas secretadas, estos factores de virulencia son trasladados por la maquinaria Sec a través de la membrana plasmática. Las proteínas secretadas por la maquinaria Sec portan un péptido líder N-terminal que es eliminado por una peptidasa líder una vez que la pre-proteína se acopla en el translocón Sec (Dalbey and Wickner, 1985; van Wely *et al.*, 2001). Un análisis reciente del genoma sugiere que las Actinobacterias y miembros de los Firmicutes codifican un sistema de secreción adicional que reconoce un subconjunto de proteínas de manera independiente de Sec (Pallen, 2002). El ESAT-6 (antígeno diana de secreción temprana de 6 kDa, del inglés "early secreted antigen target 6 kDa") y el CFP-10 (antígeno de 10 kDa de filtrado de cultivos) de la *Mycobacterium tuberculosis*, representan los primeros sustratos de este nuevo sistema de secreción denominado ESX-1 o Snm en *M. tuberculosis* (Andersen *et al.*, 1995; Hsu *et al.*, 2003; Pym *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2003). En el *S. aureus*, dos factores similares a ESAT-6 denominados EsxA y EsxB son secretados por la vía Ess (sistemas de secreción de ESAT-6) (Burts *et al.*, 2005).

La primera generación de vacunas dirigidas contra el *S. aureus* o contra las exoproteínas que produce, han alcanzado un éxito limitado (Lee, 1996). Persiste la necesidad de desarrollar vacunas efectivas contra infecciones estafilocócicas. También son necesarias composiciones adicionales para tratar las infecciones estafilocócicas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La proteína A (SpA)(SEQ ID NO:33), una proteína de superficie anclada a la pared celular del *Staphylococcus aureus*, permite la evasión bacteriana de las respuestas inmunes innatas y adaptativa. La proteína A se une a las inmunoglobulinas en su porción Fc, interactúa con el dominio VH3 de los receptores de células B estimulando de forma inapropiada la proliferación de células B y la apoptosis, se une a los dominios A1 del factor de von Willebrand para activar la coagulación intracelular, y además se une al receptor 1 del TNF para contribuir a la patogénesis de la neumonía estafilocócica. Debido al hecho de que la proteína A captura la inmunoglobulina y muestra atributos tóxicos, no se ha seguido de manera rigurosa la posibilidad de que esta molécula de superficie pueda funcionar como una vacuna en humanos. Aquí los inventores demuestran que las variantes de la proteína A que ya no son capaces de unirse a las inmunoglobulinas, a las que se elimina así su potencial toxigénico, es decir, son no toxigénicas, estimulan las respuestas inmunes humorales que protegen contra enfermedades estafilocócicas.

La presente invención hace referencia a un polipéptido aislado que comprende una variante de la proteína A (SpA) que tiene (a) al menos dos sustituciones de aminoácidos que interrumpen la unión a Fc que comprende una sustitución de aminoácidos en cada una de las posiciones de aminoácidos 9 y 10 de la SEQ ID NO: 2, y (b) al menos dos sustituciones de aminoácidos que interrumpen la unión a VH3 que comprende una sustitución de aminoácidos en cada una de las posiciones de aminoácidos 36 y 37 de la SEQ ID NO: 2, y (c) una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

En determinados modos de realización la variante de SpA es una variante de SpA de longitud completa que comprende un dominio variante A, B, C, D, y E. En determinados aspectos, la variante de SpA comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos que es un 80, 90, 95, 98, 99, o 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:34. En otras realizaciones, la variante de SpA comprende un segmento de la SpA. El segmento de la SpA puede comprender al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5 o más dominios de unión de IgG. Los dominios de IgG pueden ser al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5 o más dominios A, B, C, D, o E variantes. En determinados aspectos la variante de SpA comprende al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5, o más dominios de la variante A. En un aspecto adicional la variante de SpA comprende al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5, o más dominios de la variante B. En aún un aspecto adicional, la variante de SpA comprende al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5, o más dominios de la variante C. En aún otro aspecto adicional la variante de SpA comprende al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5, o más dominios de la variante D. En determinados aspectos la variante de SpA comprende al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5, o más dominios de la variante E. En un aspecto adicional, la variante de SpA comprende una combinación de los dominios A, B, C, D, y E en diversas combinaciones y permutaciones. Las combinaciones pueden incluir la totalidad o parte de un segmento del péptido señal de SpA, un segmento de la región X de SpA, y/o un segmento de la señal de clasificación de SpA. En otros aspectos, la variante de SpA no incluye un segmento del péptido señal de SpA, un segmento de la región X de SpA, y/o un segmento de la señal de clasificación de SpA. En ciertos aspectos un dominio A variante comprende una sustitución en la posición o posiciones 7, 8, 34, y/o 35 de la SEQ ID NO:4. En otro aspecto un dominio B variante comprende una sustitución en la posición o posiciones 7, 8, 34, y/o 35 de la SEQ ID NO:6. En aún otro aspecto un dominio C variante comprende una sustitución en la posición o posiciones 7, 8, 34, y/o 35 de la SEQ ID NO:5. En ciertos aspectos, un dominio D variante comprende una sustitución en la posición o posiciones 9, 10, 37, y/o 38 de la SEQ ID NO:2. En un aspecto adicional un dominio E variante comprende una sustitución en la posición o posiciones 6, 7, 33, y/o 34 de la SEQ ID NO:3.

En aún otros aspectos, la secuencia de aminoácidos de una variante de SpA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50%, un 60%, un 70%, un 80%, un 90%, un 95%, o un 100% idéntica, incluyendo todos los valores y rangos entre los mismos, a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOS:2-6.

En ciertos aspectos el residuo de aminoácido F5, S11, F13, Y14, L17, N28, I31, y/o K35 (SEQ ID NO:2, QQNNFNKDDQSSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNES) del subdominio de unión a Fc de la IgG del dominio D se modifican o sustituyen. En ciertos aspectos, el residuo de aminoácido Q26, G29, F30, S33, Q40, N43, y/o E47 (SEQ ID NO:2) del subdominio de unión a V_H3 del dominio D se modifican o sustituyen, de tal manera que la unión a Fc o a V_H3 es atenuada. En aspectos adicionales, pueden realizarse mediante ingeniería genética correspondientes modificaciones o sustituciones en posiciones correspondientes del dominio A, B, C, y/o E. Las posiciones correspondientes se definen mediante alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio D con una o más secuencias de aminoácidos de otros dominios de unión a IgG de la SpA, por ejemplo ver la Figura 1. En ciertos aspectos la sustitución de aminoácidos puede ser cualquiera de los diferentes 20 aminoácidos. En un aspecto adicional, las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden ser excluidas específicamente de las posibles sustituciones de aminoácidos. En otros aspectos únicamente se incluyen sustituciones no conservadoras. En cualquier caso, cualquier sustitución o combinación de sustituciones que reduzca la unión del dominio de tal manera que se reduzca de manera significativa la toxicidad de la SpA, se encuentra contemplada por la revelación. La implicación de la reducción en la unión hace referencia a una variante que produce mínima o ninguna toxicidad cuando se introduce en un sujeto y puede ser evaluado utilizando métodos *in vitro* descritos en la presente patente.

En determinados modos de realización, una variante de SpA comprende al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más péptidos del dominio D de la variante de SpA. En ciertos aspectos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, o 19 o más residuos de aminoácidos de la variante de SpA se sustituyen o modifican – incluyendo pero sin limitarse a los aminoácidos F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31, y/o K35 (SEQ ID NO:2) del subdominio de unión a Fc de la IgG del dominio D y el residuo de aminoácido Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, y/o E47 (SEQ ID NO:2) del subdominio de unión a V_H3 del dominio D. Los mutantes/las variantes de la SpA-D o SpA no toxigénica purificadas descritas en la presente patente, ya no son capaces de unirse de forma significativa (es decir, demuestran una afinidad de unión atenuada o interrumpida) a Fc γ o a F(ab) $_2$ V_H3, y además no estimulan la apoptosis de las células B. Estas variantes no toxigénicas de la proteína A se pueden utilizar como vacunas subunitarias y elevar las respuestas inmunes humores, y conferir inmunidad protectora contra la prueba de provocación del *S. aureus*. En comparación con la proteína A de longitud completa de tipo silvestre o la SpA-dominio D de tipo silvestre, la inmunización con las variantes de SpA-D dieron como resultado un incremento en el anticuerpo específico de la proteína A. Utilizando un modelo con ratón de la prueba de provocación estafilocócica y la formación de abscesos, se observó que la inmunización con las variantes de la proteína A no toxigénicas generaron una protección significativa contra la infección estafilocócica y la formación abscesos. Como prácticamente todas las cepas de *S. aureus* expresan la proteína A, la inmunización de humanos con las variantes no toxigénicas de la proteína A pueden neutralizar este factor de virulencia y, de esta manera, establecer inmunidad protectora. En determinados aspectos, la inmunidad protectora protege de, o mejora, la infección por cepas de estafilococos resistentes a fármacos, tales como la USA300 y otras cepas SARM.

Los modos de realización incluyen el uso de las variantes de la proteína A en métodos y composiciones para el tratamiento de infecciones bacterianas y/o estafilocócicas. Esta aplicación también proporciona una composición inmunogénica que comprende una variante de la proteína A o un fragmento inmunogénico de la misma. En ciertos aspectos, el fragmento inmunogénico es un segmento del dominio D de la proteína A. Además, la presente invención proporciona métodos y composiciones que pueden ser utilizadas para tratar (por ejemplo, limitar la formación y/o persistencia de abscesos estafilocócicos en un sujeto) o prevenir una infección bacteriana. En algunos casos, los métodos para estimular una respuesta inmune implican administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición que incluye o codifica la totalidad o parte de un polipéptido o antígeno de la variante de la proteína A, y en ciertos aspectos otras proteínas bacterianas. Otras proteínas bacterianas incluyen, pero no se limitan a (i) un factor de virulencia secretado, y/o una proteína o péptido de la superficie celular, o (ii) una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un factor de virulencia secretado, y/o una proteína o péptido de la superficie celular.

En otros aspectos, se puede administrar al sujeto la totalidad o parte de una variante de la proteína A, tal como un segmento del dominio D de la variante de la proteína A. El polipéptido de la invención puede formularse en una composición farmacéuticamente aceptable. La composición puede además comprender uno o más de, al menos o como máximo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, o 19 antígenos estafilocócicos adicionales o un fragmento inmunogénico del mismo (por ejemplo, Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla (por ejemplo, mutantes H35), IsdC, SasF, vWbp, o vWh). Entre los antígenos estafilocócicos adicionales que pueden utilizarse en combinación con una variante de la proteína A se incluyen, sin limitarse a, la proteína de unión a vitronectina de 52kDa (WO 01/60852), Aaa (GenBank CAC80837), Aap (nº de acceso del GenBank AJ249487), Ant (número de acceso del GenBank NP_372518), autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (US6008341), proteína de unión a fibronectina (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, Lipasa GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo de MHC II (US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora del ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 00/12689), SdrG / Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), exotoxinas SEA (WO 00/02523), exotoxinas SEB (WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2, y/o proteína de unión a Vitronectina

(ver las publicaciones PCT WO2007/113222, WO2007/113223, WO2006/032472, WO2006/032475, WO2006/032500). El antígeno estafilocócico o fragmento inmunogénico puede ser administrado de forma concurrente con la variante de la proteína A. El antígeno estafilocócico o fragmento inmunogénico y la variante de la proteína A puede ser administrado en la misma composición. La variante de la proteína A puede además ser una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una variante de la proteína A. Una molécula de ácido nucleico recombinante puede codificar la variante de la proteína A y al menos un antígeno estafilocócico o un fragmento inmunogénico del mismo. Tal como se utiliza en la presente patente, el término "modular" o "modulación" abarca los significados de las palabras "aumentar" o "inhibir". La "modulación" de la actividad puede ser tanto un incremento como una disminución de la actividad. Tal como se utiliza en la presente patente, el término "modulador" hace referencia a compuestos que efectúan la función de una fracción, incluyendo la regulación por incremento, inducción, estimulación, inhibición, regulación por disminución, o supresión de una proteína, ácido nucleico, gen, organismo o similar.

En determinados modos de realización los métodos y composiciones utilizan o incluyen o codifican la totalidad o parte del antígeno o variante de la proteína A. En otros aspectos, la variante de la proteína A puede ser utilizada en combinación con factores secretados o antígenos de superficie incluyendo, pero sin limitarse a uno o más de un polipéptido Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, o vWh aislado o un segmento inmunogénico del mismo. Los antígenos estafilocócicos adicionales que pueden ser utilizados en combinación con una variante de la proteína A se encuentran descritos anteriormente.

En aún otros aspectos, la variante de la proteína A aislada se multimeriza, *por ejemplo*, dimeriza en una fusión lineal de dos o más polipéptidos o segmentos peptídicos. En ciertos aspectos de la invención, una composición comprende multímeros o concatámeros de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más proteínas de la superficie celular aisladas o segmentos de las mismas. Los concatámeros son polipéptidos lineales que tienen una o más unidades peptídicas de repetición. Los polipéptidos o fragmentos de SpA pueden ser consecutivos o estar separados mediante un espaciador u otras secuencias peptídicas, *por ejemplo*, uno o más péptidos bacterianos adicionales. En un aspecto adicional, los demás polipéptidos o péptidos contenidos en el multímero o concatámero pueden incluir, pero no están limitados a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 de Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh o fragmentos inmunogénicos de los mismos. Los antígenos estafilocócicos que pueden utilizarse en combinación con una variante de la proteína A se encuentran descritos anteriormente.

El término "variante de la proteína A" o "variante de la SpA" hace referencia a polipéptidos que incluyen un dominio de la IgG de SpA con dos o más sustituciones de aminoácidos que interrumpen la unión a Fc y a V_H3. En un aspecto determinado, la variante de SpA incluye un péptido de dominio D de la variante, además de variantes de polipéptidos de SpA y segmentos de los mismos que son no toxigénicos y estimulan una respuesta inmune contra la proteína A de las bacterias estafilococos y/o bacterias que los expresan.

Los modos de realización de la presente invención incluyen métodos para provocar una respuesta inmune contra una bacteria estafilococo o estafilococos en un sujeto, que comprende proporcionar la sujeto una cantidad efectiva de una variante de la proteína A o un segmento de la misma. En determinados aspectos, los métodos para provocar una respuesta inmune contra una bacteria estafilococo o estafilococos en un sujeto comprenden proporcionar al sujeto una cantidad efectiva de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o más proteínas secretadas y/o proteínas de la superficie celular o segmentos/fragmentos de las mismas. Una proteína secretada o una proteína de superficie celular incluye, pero no se limita a las proteínas Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, y/o vWh y fragmentos inmunogénicos de las mismas. Los antígenos estafilocócicos adicionales que pueden utilizarse en combinación con una variante de la proteína A se encuentran descritos anteriormente.

Los modos de realización de la invención incluyen composiciones que incluyen una variante de la SpA que es al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica o similar a la proteína A, o una segunda proteína o péptido que es una proteína bacteriana secretada o una proteína de la superficie celular bacteriana. En un modo de realización de la invención una composición puede incluir una variante de la SpA que sea al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica o similar a un polipéptido del dominio D (SEQ ID NO:2), dominio E (SEQ ID NO:3), dominio A (SEQ ID NO:4), dominio C (SEQ ID NO:5), dominio B (SEQ ID NO:6) de la proteína A, o a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido del dominio D, dominio E, dominio A, dominio C, o dominio B de la proteína A. En ciertos aspectos la variante de SpA tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. Se conoce en el arte la similitud o la identidad de secuencias, siendo preferida la identidad, y pueden utilizarse una cantidad de diferentes programas para identificar si una proteína (o ácido nucleico) tiene identidad o similitud de secuencia con respecto a una secuencia conocida. La identidad y/o similitud de una secuencia se determina utilizando técnicas estándar conocidas en el arte, incluyendo, pero sin limitarse a, el algoritmo de identidad de secuencias de Smith & Waterman (1981), mediante el algoritmo de alineación de identidad de la secuencia de Needleman & Wunsch (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, de Genetics Computer Group, 575

Science Drive, Madison, Wis.), el programa de secuencias Best Fit descrito por Devereux *et al.* (1984), preferiblemente utilizando los ajustes por defecto, o mediante inspección. Preferiblemente, el porcentaje de identidad se calcula utilizando herramientas de alineamiento conocidas, y fácilmente verificables, para los expertos en el arte. El porcentaje de identidad es esencialmente el número de aminoácidos idénticos dividido por el número total de aminoácidos multiplicado por cien.

Aún otros modos de realización incluyen vacunas que comprenden un polipéptido o composición de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable del mismo. En determinados aspectos de la invención el polipéptido de la variante de SpA aislado, o cualquier otra combinación o permutación de la proteína o proteínas o péptido o péptidos descritos se multimerizan, *por ejemplo*, dimerizan o concatamerizan. En otro aspecto, la composición de la vacuna está contaminada por menos de aproximadamente un 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,05% (o cualquier rango que pueda obtenerse entre los mismos) de otras proteínas estafilocócicas. Una composición puede además comprender un polipéptido no SpA aislado. Habitualmente, la vacuna comprende un adyuvante. En ciertos aspectos una proteína o péptido de la invención está enlazada (de forma covalente o no covalente) al adyuvante, preferiblemente el adyuvante se conjuga químicamente con la proteína.

Aún otros modos de realización incluyen composiciones para su uso en métodos para estimular en un sujeto una respuesta inmune terapéutica o protectora contra la bacteria estafilococo que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la composición del polipéptido de una variante de SpA o un segmento/fragmento del mismo, y que además comprende una o más proteínas o péptidos Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, o vWh de los mismos. En un modo de realización preferido la composición comprende una bacteria no estafilococo. En un aspecto adicional la composición está formulada en forma de una formulación farmacéuticamente aceptable. Los estafilococos para los que el sujeto está siendo tratado pueden ser *Staphylococcus aureus*. Los métodos de la invención incluyen además composiciones de la variante de SpA que contienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o más factores de virulencia secretados y/o proteínas de la superficie celular, tales como Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, o vWh en diversas combinaciones. En ciertos aspectos una formulación para vacuna incluye Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, y vWh. En ciertos aspectos una combinación de antígenos puede incluir (1) una variante de SpA y IsdA; (2) una variante de SpA y ClfB; (3) una variante de SpA y SdrD; (4) una variante de SpA y Hla o una variante de Hla; (5) una variante de SpA y ClfB, SdrD, y Hla o una variante de Hla; (6) una variante de SpA, IsdA, SdrD, y Hla o una variante de Hla; (7) una variante de SpA, IsdA, ClfB, y Hla o una variante de Hla; (8) una variante de SpA, IsdA, ClfB, y SdrD; (9) una variante de SpA, IsdA, ClfB, SdrD y Hla o una variante de Hla; (10) una variante de SpA, IsdA, ClfB, y SdrD; (11) una variante de SpA, IsdA, SdrD, y Hla o una variante de Hla; (12) una variante de SpA, IsdA, y Hla o una variante de Hla; (13) una variante de SpA, IsdA, ClfB, y Hla o una variante de Hla; (14) una variante de SpA, ClfB, y SdrD; (15) una variante de SpA, ClfB, y Hla o una variante de Hla; o (16) una variante de SpA, SdrD, y Hla o una variante de Hla.

En determinados aspectos, una bacteria que administra una composición de la invención será limitada o atenuada con respecto al crecimiento o formación de abscesos prolongada o persistente. En aún otro aspecto, la variante o variantes de SpA pueden ser sobre-expresadas en una bacteria atenuada para aumentar o complementar más aún una respuesta inmune o la formulación de una vacuna.

Ciertos modos de realización están dirigidos a composiciones para su uso a la hora de provocar una respuesta inmune contra una bacteria estafilococo en un sujeto que comprende proporcionar al sujeto una cantidad efectiva de un polipéptido o composición de la invención.

En ciertos aspectos, el sujeto está diagnosticado con una infección estafilocócica persistente.

El término "proteína EsxA" hace referencia a una proteína que incluye polipéptidos EsxA de tipo silvestre aislados de bacterias estafilococos y segmentos de los mismos, además de variantes que estimulan la respuesta inmune contra las proteínas EsxA de bacterias estafilococos. De forma similar, los términos "proteína EsxB", "proteína SdrD", "proteína SdrE", "proteína IsdA", "proteína IsdB", "proteína Eap", "proteína Ebh", "proteína Emp", "proteína EsaB", "proteína EsaC", "proteína SdrC", "proteína ClfA", "proteína ClfB", "proteína Coa", "proteína Hla", "proteína IsdC" y "proteína SasF" hacen referencia a proteínas que incluyen polipéptidos aislados de tipo silvestre EsxA, EsxB, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, SdrC, ClfA, ClfB, CoA, Hla, IsdC o SasF de bacterias estafilocócicas y segmentos de los mismos, además de variantes que simulan una respuesta inmune contra proteínas EsxA, EsxB, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, SdrC, ClfA, ClfB, CoA, Hla, IsdC o SasF de bacterias estafilococos.

El término "proteína vWbp" hace referencia a una proteína que incluye polipéptidos de vWbp (proteína de unión al factor de von Willebrand) de tipo silvestre aislados de bacterias estafilococos y segmentos de los mismos, además de variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas vWbp de bacterias estafilococos.

El término "proteína vWbp" hace referencia a una proteína que incluye polipéptidos de vWbp (homólogo de la proteína de unión al factor de von Willebrand) de tipo silvestre aislados de bacterias estafilococos y segmentos de los mismos, además de variantes que estimulan una respuesta inmune contra las proteínas vWbp de bacterias estafilococos.

- 5 Una respuesta inmune hace referencia a una respuesta humoral, a una respuesta celular, o a ambas respuestas, la humoral y la celular, en un organismo. Una respuesta inmune puede medirse mediante ensayos que incluyen, pero no se limitan a, ensayos que miden la presencia o la cantidad de anticuerpos que reconocen de forma específica una proteína o una proteína de la superficie celular, ensayos que miden la activación o proliferación de linfocitos T, y/o ensayos que miden la modulación en términos de la actividad o expresión de una o más citoquinas.
- 10 En aún otros modos de realización de la invención, una composición puede incluir un polipéptido, péptido, o proteína que sea o sea al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica o similar a una proteína EsxA, EsxB, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, EsaB, ClfB, IsdC, SasF, SdrC, ClfA, Eap, Ebh, Emp, EsaC, CoA, Hla, vWa o vWbp. En ciertos aspectos la proteína EsxA tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11.
- 15 En ciertos aspectos la proteína EsxB tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12.
En ciertos aspectos la proteína SdrD tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13.
En ciertos aspectos la proteína SdrE tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14.
En ciertos aspectos la proteína IsdA tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15.
En ciertos aspectos la proteína IsdB tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16.
- 20 En ciertos aspectos la proteína EsaB tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:17.
En ciertos aspectos la proteína ClfB tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:18.
En ciertos aspectos la proteína IsdC tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:19.
En ciertos aspectos la proteína SasF tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20.
En ciertos aspectos la proteína SdrC tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:21.
- 25 En ciertos aspectos la proteína ClfA tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:22.
En ciertos aspectos la proteína Eap tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:23.
En ciertos aspectos la proteína Ebh tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:24.
En ciertos aspectos la proteína Emp tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:25.
En ciertos aspectos la proteína EsaC tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:26.
- 30 La secuencia de los polipéptidos EsaC pueden encontrarse en las bases de datos de proteínas e incluyen, pero no se limitan a, los números de acceso ZP_02760162 (GI:168727885), NP_645081.1 (GI:21281993), y NP_370813.1 (GI:15923279).
En ciertos aspectos la proteína Coa tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:27.
En ciertos aspectos la proteína Hla tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:28.
- 35 En ciertos aspectos la proteína vWa tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:29.
En ciertos aspectos la proteína vWbp tendrá toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32.
En ciertos aspectos, un polipéptido o segmento/fragmento puede tener una secuencia que sea al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, o al menos un 99% o más idéntica a la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. El término "similitud" hace referencia a un polipéptido que tiene una

secuencia que tiene un determinado porcentaje de aminoácidos que o bien son idénticos con el polipéptido de referencia o constituyen sustituciones conservadoras con los polipéptidos de referencia.

Los polipéptidos revelados en la presente patente pueden incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más aminoácidos de la variante dentro de al menos, o como máximo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 1000 o más aminoácidos contiguos, o cualquier rango que se pueda obtener entre los mismos, de la SEQ ID NO:2-30, o SEQ ID NO:32-34.

Un segmento de polipéptido tal como se revela en la presente patente puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 300, 400, 500, 550, 1000 o más aminoácidos contiguos, o cualquier rango que se pueda obtener entre los mismos, de la SEQ ID NO:2-30, o SEQ ID NO:33-34.

Las composiciones pueden ser formuladas en una composición farmacéuticamente aceptable. En ciertos aspectos de la invención, la bacteria estafilococo es una bacteria *S. aureus*.

En aspectos adicionales, una composición puede ser administrada más de una vez a un sujeto, y puede ser administrada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más veces. La administración de las composiciones incluye, pero no se limita a, la vía oral, parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, o diversas combinaciones de las mismas, incluyendo inhalación o aspiración.

En aún modos de realización adicionales, una composición comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido de la variante de SpA descrita en la presente patente o segmentos/fragmentos del mismo. Habitualmente, una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido descrito en la presente patente contiene un promotor heterólogo. En ciertos aspectos, una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención es un vector, en aún otros aspectos el vector es un plásmido. En ciertos modos de realización el vector es un vector vírico. En ciertos aspectos una composición incluye una bacteria no estafilococo recombinante que contiene o expresa un polipéptido descrito en la presente patente. En aspectos especiales, la bacteria no estafilococo recombinante es *Salmonella* u otra bacteria gram-positiva. Una composición se administra habitualmente a mamíferos, tales como sujetos humanos, pero se contempla la administración a otros animales que sean capaces de provocar una respuesta inmune. En otros aspectos, la bacteria estafilococo que contiene o expresa el polipéptido es *Staphylococcus aureus*. En modos de realización adicionales la respuesta inmune es una respuesta inmune protectora.

En modos de realización adicionales, una composición comprende una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica todo o parte de una o más proteína Eap, Ebh, Emp, EsaB, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, SpA, vWbp, o vWh o péptido o variante de la misma. Se describen anteriormente antígenos estafilocócicos que pueden ser utilizados en combinación con los polipéptidos descritos en la presente patente. En aspectos en particular, una bacteria es una bacteria no estafilococo recombinante, tal como la *Salmonella* u otra bacteria gram-positiva.

Las composiciones de la invención se administran habitualmente a sujetos humanos, pero se contempla la administración a otros animales que son capaces de provocar una respuesta inmune a una bacteria estafilococo, en particular ganado, caballos, cabras, ovejas y otros animales domésticos, es decir, mamíferos.

En ciertos aspectos, la bacteria estafilococo es un *Staphylococcus aureus*. En modos de realización adicionales la respuesta inmune es una respuesta inmune protectora. En aún otros aspectos, los métodos y composiciones de la invención son para su uso en la prevención, mejora, reducción o tratamiento de la infección de tejidos o glándulas,

por ejemplo, glándulas mamarias, en particular mastitis y otras infecciones. Otros métodos incluyen, pero no se limitan a reducir de forma profiláctica la carga bacteriana en un sujeto que no muestra signos de infección, en particular aquellos sujetos que se sospecha están o se encuentran en riesgo de ser colonizados por una bacteria diana, por ejemplo, pacientes que están o estarán en riesgo o serán susceptibles de infección durante una estancia, tratamiento, y/o recuperación en el hospital.

Cualquier modo de realización tratada con respecto a un aspecto de la invención también se aplica a otros aspectos de la invención. En particular, cualquier modo de realización tratado en el contexto de un polipéptido o péptido o ácido nucleico de la variante de SpA puede ser implementado con respecto a otros antígenos, tales como Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, proteína de unión a vitronectina de 52kDa (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a Elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (US6008341), proteína de unión a Fibronectina (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, Lipasa GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo de MHC II (US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora del ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 00/12689), SdrG / Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), exotoxinas SEA (WO 00/02523), exotoxinas SEB (WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2, y/o proteína de unión a Vitronectina (o ácidos nucleicos), y vice versa. Se entiende también que una cualquiera o más de Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsxA, EsxB, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, Coa, Hla, IsdC, SasF, vWbp, vWh, proteína de unión a vitronectina de 52kDa (WO 01/60852), Aaa, Aap, Ant, autolisina glucosaminidasa, autolisina amidasa, Cna, proteína de unión a colágeno (US6288214), EFB (FIB), proteína de unión a Elastina (EbpS), EPB, FbpA, proteína de unión a fibrinógeno (US6008341), proteína de unión a Fibronectina (US5840846), FnbA, FnbB, GehD (US 2002/0169288), HarA, HBP, transportador ABC inmunodominante, IsaA/PisA, receptor de laminina, Lipasa GehD, MAP, transportador de Mg²⁺, análogo de MHC II (US5648240), MRPII, Npasa, proteína activadora de ARN III (RAP), SasA, SasB, SasC, SasD, SasK, SBI, SdrF (WO 00/12689), SdrG / Fig (WO 00/12689), SdrH (WO 00/12689), exotoxinas SEA (WO 00/02523), exotoxinas SEB (WO 00/02523), transportador ABC de SitC y Ni, proteína de unión a SitC/MntC/saliva (US5,801,234), SsaA, SSP-1, SSP-2, y/o proteína de unión a Vitronectina, puede ser excluido específicamente de una composición reivindicada.

Los modos de realización de la invención incluyen composiciones que contienen o no contienen una bacteria. Una composición puede incluir o puede no incluir una bacteria estafilocócica atenuada o viable o intacta. En ciertos aspectos, la composición comprende una bacteria que no es una bacteria estafilocócica o no contiene una bacteria estafilocócica. En ciertos modos de realización de la revelación, una composición bacteriana comprende una variante de la proteína A estafilocócica aislada o expresada de forma recombinante, o un nucleótido que codifica el mismo. La composición puede ser o incluir una bacteria estafilococo modificada por ingeniería genética de forma recombinante, que haya sido modificada de forma que comprenda modificar específicamente la bacteria con respecto a un factor de virulencia secretado o a una proteína de la superficie celular. Por ejemplo, la bacteria puede ser modificada de forma recombinante para expresar más de un factor de virulencia o una proteína de la superficie celular de lo que expresaría si no estuviera modificada.

El término "aislado" puede hacer referencia a un ácido nucleico o polipéptido que se encuentra sustancialmente libre de material celular, material bacteriano, material vírico, o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante) de su fuente de origen, o precursores químicos u otros productos químicos (cuando se sintetizan químicamente). Más aún, un compuesto aislado hace referencia a uno que puede ser administrado a un sujeto como un compuesto aislado; en otras palabras, el compuesto simplemente no puede ser considerado "aislado" si está adherido a una columna o incluido en gel de agarosa. Más aún, un "fragmento de ácido nucleico aislado" o "péptido aislado" es un fragmento de ácido nucleico o proteína que no es de origen natural como fragmento y/o no se encuentra habitualmente en estado funcional.

Las fracciones de la invención, tales como polipéptidos, péptidos, antígenos, o inmunógenos, pueden conjugarse o enlazarse de forma covalente o no covalente con otras fracciones tales como adyuvantes, proteínas, péptidos, soportes, fracciones de fluorescencia, o marcadores. El término "conjugado" o "inmunoconjugado" se utiliza ampliamente para definir la asociación operativa de una fracción con otro agente y no pretende hacer referencia exclusivamente a cualquier tipo de asociación operativa, y no está particularmente limitada a la "conjugación" química. Se contemplan en particular las proteínas de fusión recombinantes. Las composiciones de la invención pueden además comprender un adyuvante o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un adyuvante puede acoplarse de forma covalente o no covalente a un polipéptido o péptido de la invención. En ciertos aspectos, el adyuvante se conjuga químicamente con una proteína, polipéptido o péptido.

El término "proporcionar" se utiliza de acuerdo a su significado corriente para indicar "suministrar o facilitar para su uso". En algunas realizaciones, la proteína se proporciona directamente administrando la proteína, mientras que en otras realizaciones la proteína se proporciona de manera efectiva administrando un ácido nucleico que codifica la proteína. En ciertos aspectos, la invención contempla composiciones que comprenden diversas combinaciones de ácido nucleico, antígenos, péptidos, y/o epítomos.

El sujeto tendrá (por ejemplo, está diagnosticado con una infección estafilocócica), se sospecha que tiene, o estará en riesgo de desarrollar una infección estafilocócica. Las composiciones de la presente invención incluyen composiciones inmunogénicas en las que el antígeno o antígenos o el epítipo o epítipos están contenidos en una cantidad efectiva para lograr el propósito deseado. Más específicamente, una cantidad efectiva significa una cantidad de ingredientes activos necesarios para estimular o provocar una respuesta inmune, o proporcionar resistencia a, mejora de, o mitigación de una infección. En aspectos más específicos, una cantidad efectiva evita, alivia o mejora los síntomas de una enfermedad o infección, o prolonga la supervivencia del sujeto que está siendo tratado. La determinación de la cantidad efectiva se encuentra dentro de la capacidad de los expertos en el arte, en especial en vista de la revelación detallada que se proporciona en la presente patente. Para cualquier preparación utilizada en los métodos de la invención, una cantidad o dosis efectiva puede ser estimada inicialmente a partir de estudios *in vitro*, cultivos celulares, y/o ensayos con modelos animales. Por ejemplo, una dosis puede ser formulada en modelos animales para lograr una respuesta inmune deseada o concentración o título de anticuerpo circulante. Tal información puede ser utilizada para determinar de forma más precisa las dosis útiles en humanos.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para que la materia en la que las características, ventajas y objetos de la invención citados anteriormente, además de otros que serán aclarados, se logre y pueda ser comprendida en detalle, se ilustran en los dibujos adjuntos descripciones más concretas y ciertos modos de realización de la invención resumidos brevemente anteriormente. Estos dibujos forman parte de la especificación. Ha de señalarse, sin embargo, que los dibujos adjuntos ilustran ciertos modos de realización de la invención y por lo tanto no han de considerarse limitativos en su alcance.

FIGs. 1A - 1E Generación de una vacuna de proteína A no toxigénica. FIG 1A producto de la traducción de la proteína A de *S. aureus* de la cepa Newman y USA300 LAC con un péptido señal N-terminal (recuadro blanco), cinco dominios de unión a inmunoglobulina (IgBDs designados E, D, A, B y C), región variable X y señal de clasificación C-terminal (recuadro en negro). FIG. 1B, secuencia de aminoácidos de los cinco IgBDs además de SpA-D_{KKAA} no toxigénica, con las posiciones de haces de triple hélice α (H1, H2 y H3), además de glutamina (Q) 9, 10 y aspartato (D) 36, 37 indicadas. FIG. 1C, SDS-PAGE con tinción de azul Coomassie de SpA, SpA-D, SpA-D_{KKAA} o SrtA purificada sobre Ni-NTA-sefarosa en presencia o ausencia de inmunoglobulina humana (hIgG). FIG. 1D, ensayo ELISA que examina la asociación de SpA, SpA-D o SpA-D_{KKAA} inmovilizada con IgG humana, además de sus fragmentos Fc o F(ab)₂ y el factor de von Willebrand (vWF). FIG. 1E, se cuantificaron linfocitos CD19+ B en tejido esplénico de ratones BALB/c que habían sido inmunizados con células mock (inactivas) o tratados con SpA-D o SpA-D_{KKAA} mediante el método FACS.

FIG. 2 La vacuna de proteína A no toxigénica evita la formación de abscesos. Histopatología de tejido renal aislado durante la necropsia de ratones BALB/c que habían sido inmunizados de forma ficticia (PBS) o vacunados con SpA, SpA-D además de SpA-D_{KKAA} y con los que se realizó una prueba de provocación con *S. aureus* Newman. Los tejidos en secciones finas se colorearon con hematoxilina-eosina. Las flechas de color blanco identifican infiltrados de leucocitos polimorfonucleares (PMN). Las flechas oscuras identifican comunidades de abscesos estafilocócicos.

FIGs. 3A-C Los anticuerpos generados por la vacuna de proteína A no toxigénica bloquean la función superantigénica de los linfocitos B de la SpA. FIG 3A, los anticuerpos de conejo generados contra la SpA-D_{KKAA} fueron purificados sobre una matriz con antígenos inmovilizados y se analizaron mediante SDS-PAGE con tinción de azul Coomassie. Los anticuerpos se escindieron con pepsina y se purificaron los fragmentos de F(ab)₂ mediante una segunda vuelta de cromatografía por afinidad sobre una matriz de SpA-D_{KKAA}. FIG 3B, la F(ab)₂ específica de SpA-D_{KKAA} interfiere con la unión de la SpA o SpA-D a la inmunoglobulina humana (hIgG) o, FIG 3C, al factor de von Willebrand (vWF).

FIGs. 4A-D La proteína A no toxigénica de longitud completa genera respuestas inmunes mejoradas. FIG 4A, la SpA_{KKAA} de longitud completa se purificó sobre Ni-NTA-sefarosa y se analizó mediante SDS-PAGE con tinción de azul Coomassie. FIG 4B, se cuantificaron los linfocitos - CD19+ B en tejido esplénico de ratones BALB/c que habían sido inmunizados de forma ficticia o tratados con SpA o SpA_{KKAA}, mediante FACS. FIG 4C, ensayo ELISA que examina la asociación de SpA o SpA_{KKAA} inmovilizada con IgG humana, además de sus fragmentos Fc o F(ab)₂ o factor de von Willebrand (vWF). FIG 4D, títulos de suero de anticuerpos de ratón o humanos para toxoide diftérico (CRM197) y SpA_{KKAA} o SpA-D_{KKAA} no toxigénica. Se examinaron mediante dot blot cuantitativo los voluntarios humanos con historia de inmunización contra DTaP e infección estafilocócica (n=16), además de ratones (n=20) que habían sido infectados con *S. aureus* Newman o USA 300 LAC o inmunizados con SpA_{KKAA} o SpA-D_{KKAA}.

FIG. 5 La proteína A se requiere para la patogénesis de las infecciones letales por *S. aureus* en ratones. Se inyectó a cohortes de ratones BALB/c (n=8) suspensiones de 2×10^8 UFC de *S. aureus* Newman o su variante de delección de la proteína A isogénica (Δ spa) en PBS. Los animales infectados se monitorizaron para determinar su supervivencia durante un periodo de 15 días.

FIGs. 6A-B Los anticuerpos contra la proteína A protegen los ratones contra infecciones letales por *S. aureus*. FIG 6A Se inyectó a cohortes de ratones BALB/c (n=10) 5 mg kg⁻¹ IgG de conejo purificado por afinidad específico para

SpA_{KKAA} (α -SpA_{KKAA}), o antígeno de la vacuna contra la peste rV10 (DeBord *et al.*, 2006) (molde). Cuatro horas más tarde, se infectó cada animal mediante inyección intraperitoneal con una suspensión de 3×10^8 UFC de *S. aureus* Newman y se monitorizaron para determinar su supervivencia durante un periodo de 10 días. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. FIG 6B Cohortes de ratones BALB/c (n=10) se inmunizaron con la estrategia inducción-refuerzo (prime-boost) con SpA_{KKAA} o control con PBS/adyuvante (molde). Cada animal se infectó posteriormente mediante inyección intraperitoneal con una suspensión de 6×10^8 UFC de *S. aureus* Newman y se monitorizaron para determinar su supervivencia durante un periodo de 10 días. Se analizó la significación estadística (P) con el test de rango logarítmico bilateral desapareado. Los datos son representativos de los tres experimentos independientes.

FIG. 7 La inmunización de SpA_{KKAA} protege los ratones contra la prueba de provocación con el aislado Mu50 de SARM resistente a la vancomicina. Se inmunizaron cohortes de ratones BALB/c con la estrategia inducción-refuerzo (prime boost) con SpA_{KKAA} o control con PBS/adyuvante (modelo). Cada animal fue infectado posteriormente mediante inyección intravenosa con una suspensión de 3×10^7 UFC de Mu50 de *S. aureus*. La carga estafilocócica, calculada como el log₁₀ UFC g⁻¹, se determinó en tejidos renales homogeneizados 4 días a continuación de la infección. La significación estadística se calculó con la prueba T de Student bilateral desapareada y el valor P registrado.

FIGs. 8A-B Carencia de respuestas inmunes protectoras a infecciones estafilocócicas. FIG 8A La infección estafilocócica no genera inmunidad protectora. Se infectaron ratones BALB/c (n=10) con *S. aureus* Newman, o se sometieron a prueba de provocación con células sin infectar o mock (PBS) durante treinta días y la infección se eliminó con tratamiento con cloranfenicol. Ambas cohortes de animales se sometieron a una prueba de provocación con *S. aureus* Newman y la carga bacteriana (UFC) en el homogeneizado de tejido de riñón se analizó tras la necropsia en el día 4. Los datos son representativos de tres análisis independientes. En la Figura 8B la inmunización con lsdB no protege los ratones contra la prueba de provocación con *S. aureus* USA300 (LAC). Se inmunizaron ratones BALB/c (n=10) con lsdB (100 µg de lsdB emulsionado en CFA seguido de refuerzo con IFA/lsdB en el día 11), y se sometieron a prueba de provocación mediante inyección retroorbital con 5×10^6 UFC de *S. aureus* USA300 (LAC) en el día 21. Cuatro días después de la prueba de provocación, los riñones fueron extraídos durante la necropsia y se procedió al conteo de la carga estafilocócica por gramo de tejido homogeneizado mediante formación de colonias sobre placas de agar. En comparación con los animales inmunizados con células sin infectar o mock (PBS/adyuvante) con un valor $6.93 (\pm 0.24) \log_{10}$ UFC g⁻¹, la vacuna con lsdB estuvo asociada con un valor $6.25 (\pm 0.46) \log_{10}$ UFC g⁻¹ y no generó una protección estadísticamente significativa (P=0.2138, prueba T de Student bilateral) de la prueba de provocación con USA300 (LAC). Los datos son representativos de tres análisis independientes.

FIG. 9 Comparación de formación de abscesos en ratones tratados con PBS, SpA, SpA-D y SpA-D_{KKAA}.

FIGs. 10A-10H Localización de protrombina, fibrinógeno, coagulasa (Coa), y proteína de unión al factor de von Willebrand (vWbp) en abscesos estafilocócicos. Los ratones BALB/c infectados mediante inoculación intravenosa con 1×10^7 UFC de *S. aureus* Newman fueron sacrificados 5 días después de la infección. Se extrajeron los riñones, se incluyeron en parafina, se prepararon en secciones finas y se colorearon mediante inmunquímica, utilizando anticuerpos (α) de conejo específicos para la protrombina de ratón (FIG. 10A, 10C), fibrinógeno/ fibrina de ratón (FIG. 10B, 10D), *S. aureus* Coa (FIG. 10E, 10G) o *S. aureus* vWbp (FIG. 10F, 10H). Las imágenes que se muestran son representativas de tres muestras de riñones. Los paneles FIG. 10C, 10D, 10G, y 10H ilustran la tinción de anticuerpos dentro de un único absceso analizado en forma de cuatro secciones secuenciales, aumentadas a partir de un área en los paneles FIG. 10A, 10B, 10E, y 10F que se define mediante el recuadro con márgenes blancos.

FIGs. 11A-11C Los mutantes de *Staphylococcus aureus* *coa* y *vWbp* muestran defectos en la coagulación sanguínea. (FIG. 11A) Diagrama que ilustra el producto de la traducción primaria de *coa* y *vWbp* que incluye el péptido señal (S), el dominio D1 y D2 de la unión a protrombina, un dominio de función desconocida, sitio de unión al factor de von Willebrand (vWF) en *vWbp*, y las repeticiones (R) de unión a fibrinógeno de Coa. Los números indican los residuos de aminoácidos. (FIG. 11B) Se examinaron sobrenadantes de cultivos de *S. aureus* Newman (tipo silvestre) o variantes isogénicas que carecen de *coa* (Δ *coa*), *vWbp* (Δ *vWbp*) o ambos genes (Δ *coa*, Δ *vWbp*) mediante inmunoblotting con anticuerpos específicos para Coa (α Coa) or *vWbp* (α vWbp). Para estudios de complementación, los plásmidos que expresan los alelos de tipo silvestre de *coa* (*pcoa*) o *vWbp* (*pvWbp*) fueron electroporados en cepas estafilocócicas y posteriormente se analizaron mediante inmunoblotting. (FIG. 11C) La sangre de ratón tratada con lepirudina fue tratada con células mock o infectadas con *S. aureus* Newman o sus variantes de coagulasa isogénica, y se incubaron durante un periodo de hasta 48 horas a 25 °C. Los tubos se inclinaron para evaluar la coagulación. Los datos son representativos de cuatro determinaciones independientes.

FIGs. 12A-12R Las contribuciones de *coa* y *vWbp* a la supervivencia bacteriana en sangre y el *S. aureus* indujeron una bacteriemia letal de los ratones. (FIG. 12A) las cepas estafilocócicas Newman, Δ *coa*, Δ *vWbp* o Δ *coa*, Δ *vWbp* y las variantes complementadas se incubaron con sangre de ratón anticoagulada con lepirudina durante 30 minutos y se evaluó la supervivencia bacteriana mediante formación de colonias sobre placas de agar. Se generaron datos a partir de tres ensayos individuales. (FIG. 12B) Se inyectó en el plexo retroorbital de cohortes de 10 ratones 1×10^8

UFC de *S. aureus* Newman (tipo silvestre) además de Δ coa, Δ vWbp o Δ coa, Δ vWbp. Se registró la supervivencia animal en el tiempo durante 10 días. Al igual que en B, se dio a los ratones 1×10^7 UFC de cepas estafilocócicas Newman (FIG. 12C, E y K, M), Δ vWbp (FIG. 14D, F y M, L), Δ coa (FIG. 14G, I y O, Q) o Δ coa, Δ vWbp (FIG. 12H, J y P, R), cosechadas en los días 5 (FIG. 12C-J) o 15 (FIG. 12K-R) y evaluadas para determinar la carga bacteriana en el tejido renal (Tabla 7) y la formación de abscesos. Todos los datos de animales son representativos de dos experimentos independientes.

FIGs. 13A-13D Los anticuerpos contra Coa y vWbp bloquean la coagulación de la sangre mediante coagulasas estafilocócicas. (FIG. 13A) His₆-Coa y His₆-vWbp se purificaron por cromatografía de afinidad a partir de *E. coli* y se analizaron sobre SDS-PAGE con tinción de Coomassie. (FIG. 13B) Los anticuerpos de conejo generados contra His₆-Coa o His₆-vWbp se purificaron por afinidad y se analizaron mediante ensayo ELISA para determinar la reactividad inmune con coagulasas purificadas. Se realizó la media de los datos a partir de tres determinaciones experimentales independientes. (FIG. 13C) Se trató sangre de ratón tratada con lepirudina con PBS (mock), anticuerpos (α V10) irrelevantes o anticuerpos dirigidos contra Coa (α Coa), vWbp (α vWbp) o ambas coagulasas both coagulasas (α Coa/ α vWbp) previamente a la infección con *S. aureus* Newman y la incubación durante 48 horas a 25°C. (FIG. 13D) Se trató sangre de ratón tratada con lepirudina con anticuerpos como anteriormente. Las muestras de sangre se incubaron a continuación con Coa o vWbp funcionalmente activos y se registró el tiempo de coagulación.

FIGs. 14A-14F Efectos biológicos de anticuerpos dirigidos contra coagulasas estafilocócicas. Medición por resonancia de plasmones de superficie de anticuerpos que altera la asociación entre Coa o vWbp y la protrombina o fibrinógeno. Se compararon las diferencias en la respuesta ante la adición de coagulasa (Coa) bien a la protrombina (FIG. 14A) o al fibrinógeno (FIG. 14B) con las diferencias en la respuesta en presencia de cantidades en aumento de anticuerpos (α Coa - 1:1, 1:2, 1:4, 1:8). Se compararon las diferencias en la respuesta ante la adición de vWbp bien a la protrombina (FIG. 14C) o al fibrinógeno (FIG. 14D) con las diferencias en la respuesta en presencia de cantidades en aumento de anticuerpos (α vWbp - 1:1, 1:2, 1:4, 1:8). (FIG. 14E, F) Se incubó Coa o vWbp activo purificado en una relación molar de 1:1 con protrombina humana. Se evaluó la capacidad enzimática del complejo monitorizando la tasa de escisión de S-2238 (sustrato cromogénico sustituto de fibrinógeno, dado en exceso). El ensayo se repitió en presencia de anticuerpos específicos o cruzados añadidos en exceso de 3M y los datos se normalizaron al % de la actividad media sin inhibición. Los datos son una media de tres ensayos independientes.

FIG. 15 Contribución de los anticuerpos específicos de coagulasa a la supervivencia de ratones con bacteriemia estafilocócica. Veinticuatro horas antes de la infección, se inyectó en el peritoneo de ratones BALB/c (n=15) anticuerpos de conejo purificados (5 mg de anticuerpo/kg peso corporal). Los animales se sometieron a continuación a una prueba de provocación con 1×10^8 UFC de *S. aureus* Newman inyectadas en el plexo retroorbital y se monitorizaron para determinar su supervivencia. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

FIGs. 16A-16H La transferencia pasiva de anticuerpos de coagulasa confiere protección contra la formación de abscesos por *S. aureus*. Se inyectó una muestra mock experimental (PBS, FIG. 18A y 18C) o anticuerpos de conejo purificados dirigidos contra vWbp (α vWbp, FIG. 18B y 18D), Coa (α Coa, FIG. 18E y 18G) o ambas coagulasas (α Coa / α vWbp, FIG. 18F and 18H) en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c (n=10) y se analizaron títulos de anticuerpos mediante ensayo ELISA (Tabla 8). Los animales con inmunización pasiva fueron infectados inyectándoles 1×10^7 UFC de *S. aureus* Newman en el plexo retroorbital. Se determinó la carga bacteriana y la formación de abscesos tras necropsia en los riñones de animales que habían sido sacrificados cinco días después de la infección. Los tejidos renales se fijaron con paraformaldehído, se incluyeron en parafina, se prepararon en secciones finas, se colorearon con hematoxilina-eosina y se adquirieron imágenes de la histopatología mediante microscopía óptica. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

FIG. 17s A-H La inmunización con coagulasas protege a los ratones contra la formación de abscesos por *S. aureus*. Se inmunizaron ratones BALB/c (n=15) con 50 μ g de His₆-Coa, His₆-vWbp, His₆-Coa y His₆-vWbp o mock (PBS) emulsionado con adyuvante en el día 0 y 11 y se analizaron títulos de anticuerpos mediante ensayo ELISA en el día 21 (Tabla 8). En el día 21, se sometió a los animales a una prueba de provocación inyectando 1×10^7 UFC de *S. aureus* Newman en el plexo retroorbital. Se determinó la carga bacteriana y la formación de abscesos a continuación de la necropsia en los riñones de los animales que habían sido sacrificados cinco días después de la infección. Los tejidos renales se fijaron con paraformaldehído, se incluyeron en parafina, se prepararon en secciones finas, se colorearon con hematoxilina-eosina y se adquirieron imágenes de la histopatología mediante microscopía óptica. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El *Staphylococcus aureus* es un comensal de la piel y los orificios nasales, y la causa principal de infecciones en la corriente sanguínea, la piel y tejidos blandos (Klevens *et al.*, 2007). El reciente y drástico incremento en la mortalidad de las enfermedades estafilocócicas se atribuye a la propagación de las cepas de *S. aureus* resistentes a la metilicina (SARM) a menudo no susceptibles a los antibióticos (Kennedy *et al.*, 2008). En un gran estudio retrospectivo, la incidencia de infecciones por SARM fue del 4,6% de todas las admisiones hospitalarias en los

Estados Unidos (Klevens *et al.*, 2007). Los costes del cuidado sanitario anual para 94.300 individuos infectados con una SARM en los Estados Unidos sobrepasan los 2,4 miles de millones de dólares (Klevens *et al.*, 2007). El actual SARM epidémica ha precipitado una crisis en la salud pública que necesita ser afrontada mediante el desarrollo de una vacuna preventiva (Boucher and Corey, 2008). Hasta la fecha, no se encuentra disponible una vacuna licenciada por la FDA que prevenga enfermedades por *S. aureus*.

Los inventores describen en la presente patente el uso de la proteína A, una proteína de superficie anclada a la pared celular de estafilococos, para la generación de variantes que puedan servir como vacunas subunitarias. La patogénesis de las infecciones estafilocócicas se inicia a medida que las bacterias invaden la piel o el torrente sanguíneo a través de un trauma, heridas quirúrgicas, o dispositivos médicos (Lowy, 1998). Aunque el patógeno invasor puede ser fagocitado y destruido, los estafilococos puede también escapar a las defensas inmunes naturales y sembrar infecciones en tejidos de los órganos, lo que induce a respuestas inflamatorias que atraen macrófagos, neutrófilos, y otros fagocitos (Lowy, 1998). La respuesta de invasión de las células inmunes en el sitio de la infección está acompañada por necrosis por licuefacción, ya que el huésped busca evitar la propagación estafilocócica y permite la eliminación de los restos de tejido necrótico (Lam *et al.*, 1963). Tales lesiones pueden ser observadas mediante microscopía como áreas hiper celulares que contienen tejido necrótico, leucocitos, y un nido central de bacterias (Lam *et al.*, 1963). A menos que los abscesos estafilocócicos se drenen quirúrgicamente y se traten con antibióticos, la infección diseminada y la septicemia producen un resultado letal (Sheagren, 1984).

III. Antígenos estafilocócicos

A. Proteína A estafilocócica (SpA)

Todas las cepas de *Staphylococcus aureus* expresan el gen estructural para la proteína A (spa) (Jensen, 1958; Said-Salim *et al.*, 2003), un factor de virulencia bien caracterizado cuyo producto proteico (SpA) de superficie anclado a la pared celular abarca cinco dominios de unión a la inmunoglobulina sumamente homólogos denominados E, D, A, B, y C (Sjodahl, 1977). Estos dominios muestran ~ 80% de identidad a nivel de los aminoácidos, son de 56 a 61 residuos de longitud, y están organizados como repeticiones en tándem (Uhlen *et al.*, 1984). La SpA se sintetiza como una proteína precursora con un péptido señal YSIRK/GS N-terminal y una señal de clasificación del motivo LPXTG C-terminal (DeDent *et al.*, 2008; Schneewind *et al.*, 1992). La proteína A anclada a la pared celular se muestra en gran abundancia en la superficie estafilocócica (DeDent *et al.*, 2007; Sjoquist *et al.*, 1972). Cada uno de sus dominios de unión a inmunoglobulina está compuesto de hélices α anti-paralelas que se unen en un haz de tres hélices y se unen al dominio Fc de la inmunoglobulina G (IgG) (Deisenhofer, 1981; Deisenhofer *et al.*, 1978), la cadena pesada de VH3 (Fab) de la IgM (es decir, el receptor de linfocitos B) (Graille *et al.*, 2000), el factor de von Willebrand en su dominio A1 [vWF A1 es un ligando para plaquetas] (O'Seaghda *et al.*, 2006) y el receptor I (TNFRI) del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Gomez *et al.*, 2006), que se muestra sobre las superficies del epitelio de las vías respiratorias (Gomez *et al.*, 2004; Gomez *et al.*, 2007).

La SpA impide la fagocitosis de neutrófilos de estafilococos mediante su característica de unirse al componente Fc de la IgG (Jensen, 1958; Uhlen *et al.*, 1984). Más aún, la SpA es capaz de activar la coagulación intravascular mediante su unión a los dominios A1 del factor de von Willebrand (Hartleib *et al.*, 2000). Las proteínas plasmáticas tales como el fibrinógeno y la fibronectina, actúan como puentes entre los estafilococos (ClfA y ClfB) y la integrina de plaquetas GPIIb/IIIa (O'Brien *et al.*, 2002), una actividad que se complementa a través de la asociación de la proteína A con vWF A1, lo que permite a los estafilococos capturar las plaquetas a través del receptor de plaquetas GPIIb- α (Foster, 2005; O'Seaghda *et al.*, 2006). La SpA también se une al TNFRI y esta interacción contribuye a la patogénesis de neumonía estafilocócica (Gomez *et al.*, 2004). La SpA activa la señalización proinflamatoria a través de la activación de TRAF2 mediada por TNFR1, la quinasa p38/c-Jun, proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y el factor de transcripción Rel NF-KB. La unión a SpA además induce el shedding (del inglés despojarse o deshacerse) del TNFR1, una actividad que parece requerir la enzima de conversión del TNF (TACE) (Gomez *et al.*, 2007). Todas las actividades de la SpA antes mencionadas están mediadas a través de sus cinco dominios de unión a la IgG y pueden ser alteradas por las mismas sustituciones de aminoácidos, inicialmente definidas por su requerimiento para la interacción entre la proteína A y la IgG1 humana (Cedergren *et al.*, 1993).

La SpA además funciona como un superantígeno de linfocitos B capturando la región Fab de la IgM que porta VH3, el receptor de linfocitos B (Gomez *et al.*, 2007; Goodyear *et al.*, 2003; Goodyear y Silverman, 2004; Roben *et al.*, 1995). A continuación de la prueba de provocación por vía intravenosa, las mutaciones de la proteína A estafilocócica (SpA) muestran una reducción en la carga estafilocócica en los tejidos de los órganos y reduce de forma drástica la capacidad de formar abscesos (descrita en la presente patente). Durante la infección con *S. aureus* de tipo silvestre, los abscesos se forman dentro de un periodo de 48 horas y se pueden detectar mediante microscopía óptica de tejido renal seccionado en secciones finas y coloreado con hematoxilina-eosina, inicialmente marcado por un influjo de leucocitos polimorfonucleares (PMNs). En el día 5 de la infección, los abscesos aumentan de tamaño y encierran una población central de estafilococos, rodeada por una capa de material amorfo eosinofílico y una gran masa de PMNs. La histopatología reveló una necrosis masiva de PMNs en la proximidad del nido estafilocócico en el centro de las lesiones de abscesos además de una capa de fagocitos saludables. Los inventores además observaron un borde de PMNs necróticos en la periferia de lesiones de abscesos, bordeando la

pseudocápsula eosinofílica que separaba el tejido renal saludable de la lesión infecciosa. Las variantes estafilocócicas que carecen de la proteína A no son capaces de establecer las características de la histopatología de los abscesos y se eliminan durante la infección.

O'Seaghda *et al.* (2006) describe estudios sobre dilucidar qué subdominio del dominio D se une a vWF. Los autores generaron únicas mutaciones bien en los subdominios de unión a Fc o a VH3, es decir, los residuos de aminoácidos F5A, Q9A, Q10A, F13A, Y14A, L17A, N28A, I31A, K35A, G29A, F30A, S33A, D36A, D37A, Q40A, E47A, o Q32A. Los autores descubrieron que el vWF se une al mismo subdominio que se une a Fc. O'Seaghda *et al.* define el subdominio del dominio D responsable de la unión a vWF, pero está silenciado con respecto a cualquier uso de sustituciones en los residuos que interactúan en la producción de un antígeno de vacuna.

La proteína A recombinante con etiquetas de afinidad, un polipéptido que abarca los cinco dominios de la IgG (EDCAB) (Sjodahl, 1977) pero que carece de la región X C-terminal (Guss *et al.*, 1984), se purificó de *E. coli* recombinante y se utilizó como un antígeno para vacuna (Stranger-Jones *et al.*, 2006). Debido a la propiedad de la SpA de unirse a la porción Fc de la IgG, no puedo medirse una respuesta inmune humoral específica a la proteína A (Stranger-Jones *et al.*, 2006). Los inventores han sobrepasado este obstáculo a través de la generación de SpA-DQ9,10K;D36,37A. Los ratones BALB/c inmunizados con la proteína A recombinante (SpA) mostraron una protección significativa contra la prueba de provocación por vía intravenosa con cepas de *S. aureus*: una reducción logarítmica de 2,951 en la carga estafilocócica en comparación con el tipo silvestre ($P > 0,005$; prueba T de Student) (Stranger-Jones *et al.*, 2006). Los anticuerpos específicos de SpA pueden causar un aclaramiento fagocítico previo a la formación de abscesos de la barrera eosinofílica mencionada anteriormente en los abscesos que separan las comunidades estafilocócicas de las células inmunes, ya que estas no se forman durante la infección con las cepas de mutantes de la proteína A. Cada uno de los cinco dominios de la SpA (es decir, dominios formados a partir de haces de tres hélices denominados E, D, A, B, y C) ejerce propiedades de unión similares (Jansson *et al.*, 1998). La estructura cristalina y en solución del dominio D se ha solucionado con y sin los ligandos Fc y VH3 (Fab), los cuales se unen a la proteína A de forma no competitiva en sitios distintos (Graille *et al.*, 2000). Las mutaciones en los residuos que se sabe están implicados en la unión a IgG (FS, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 and K35), también se requieren para la unión de vWF A1 y TNFR1 (Cedergren *et al.*, 1993; Gomez *et al.*, 2006; O'Seaghda *et al.*, 2006), mientras que los residuos importantes para la interacción de VH3 (Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, E47) parecen no tener impacto sobre las otras actividades de unión (Graille *et al.*, 2000; Jansson *et al.*, 1998). La SpA establece como diana específicamente un subconjunto de linfocitos B que expresa IgM relacionada con la familia VH3 en su superficie, es decir, receptores de linfocitos B de tipo VH3 (Roben *et al.*, 1995). Ante la interacción con SpA, estos linfocitos B proliferan y se destinan a la apoptosis, lo que conduce a una delección preferencial y prolongada de los linfocitos B de tipo innatos (es decir, los linfocitos B de la zona marginal y los linfocitos B2 foliculares) (Goodyear *et al.*, 2003; Goodyear *et al.*, 2004).

Base molecular de la función y presentación de la superficie de la proteína A. La proteína A se sintetiza como precursor en el citoplasma bacteriano y secretada a través de su péptido señal YSIRK en su pared transversal, es decir, el septo de división celular de los estafilococos (FIG. 1) (DeDent *et al.*, 2007; De Dent *et al.*, 2008). Después de la escisión de la señal de clasificación LPXTG C-terminal, la proteína A se encuentra anclada a puentes transversales del péptidoglicano bacteriano mediante sortasa A (Mazmanian *et al.*, 1999; Schneewind *et al.*, 1995; Mazmanian *et al.*, 2000). La proteína A es la proteína de superficie más abundante de los estafilococos; la molécula es expresada por prácticamente todas las cepas de *S. aureus* (Cespedes *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2008; Said-Salim *et al.*, 2003). Los estafilococos giran alrededor de un 15-20% de su pared celular por ciclo de división (Navarre and Schneewind, 1999). Las hidrolasas murinas cortan las cadenas de glicano y los péptidos de pared del péptidoglicano, liberando de este modo la proteína A con su tetrapéptido disacárido de la pared celular C-terminal hacia el medio extracelular (Ton-That *et al.*, 1999). Por tanto, mediante su diseño fisiológico, la proteína A es anclada a la pared celular y mostrada sobre la superficie bacteriana, pero también se libera hacia los tejidos circundantes durante la infección del huésped (Marraffini *et al.*, 2006).

La proteína A captura inmunoglobulinas en la superficie bacteriana y esta actividad bioquímica permite el escape estafilocócico de las respuestas inmunes innatas y adquiridas del huésped (Jensen, 1958; Goodyear *et al.*, 2004). De manera interesante, la región X de la proteína A (Guss *et al.*, 1984), un dominio de repetición que une los dominios de unión a IgG a la señal de clasificación LPXTG / anclaje a la pared celular, es quizás la porción más variable del genoma estafilocócico (Said-Salim, 2003; Schneewind *et al.*, 1992). Cada uno de los cinco dominios de unión a la inmunoglobulina de la proteína A (SpA), formados a partir de haces de tres hélices y denominados E, D, A, B, y C, ejerce propiedades funcionales y estructurales similares (Sjodahl, 1977; Jansson *et al.*, 1998). La estructura cristalina y en solución del dominio D se ha resuelto con y sin los ligandos Fc y VH3 (Fab), los cuales se unen a la proteína A de una forma no competitiva en distintos sitios (Graille 2000).

En el complejo de estructura cristalina, la región Fab interactúa con la hélice II y la hélice III del dominio D a través de una superficie compuesta de cuatro cadenas β de la región VH (Graille 2000). El eje mayor de la hélice II del dominio D es de aproximadamente 50° con respecto a la orientación de las cadenas, y la porción interhelicoidal del dominio D es la más proximal con respecto a la cadena C0. El sitio de interacción en Fab se encuentra apartado de la región constante de la cadena pesada y la cadena ligera de la Ig. La interacción implica los siguientes residuos del

dominio D: Asp-36 de la hélice II, Asp-37 y Gln-40 en el bucle entre la hélice II y la hélice II y otros residuos diversos (Graille 2000). Ambas superficies interactuantes están compuestas predominantemente de cadenas laterales polares, con tres residuos de carga negativa en el dominio D y dos residuos de carga positiva en la Fab 2A2 sumergida por la interacción, lo que proporciona una atracción electrostática global entre las dos moléculas. De las cinco interacciones polares identificadas entre Fab y el dominio D, tres son entre cadenas laterales. Se forma un puente de sal entre Arg-H19 y Asp-36 y se realizan dos enlaces de hidrógeno entre Tyr-H59 y Asp-37 y entre Asn-H82a y Ser-33. Debido a la conservación de Asp-36 y Asp-37 en todos los cinco dominios de unión a IgG de la proteína A, los inventores mutaron estos residuos.

Los sitios SpA-D responsables de la unión a Fab se encuentran estructuralmente separados de la superficie del dominio que hace de mediador en la unión a Fcγ. La interacción de Fcγ con el dominio D implica principalmente a los residuos en la hélice I, con una menor implicación de la hélice II (Gouda *et al.*, 1992; Deisenhofer, 1981). Con la excepción de la Gln-32, un contacto de poca importancia en ambos complejos, ninguno de los residuos que hacen de mediadores en la interacción de Fcγ, están implicados en la unión a Fab. Para examinar la relación espacial entre estos diferentes sitios de unión a Ig, los dominios de SpA en estos complejos han sido superpuestos para construir el modelo de un complejo entre Fab, el dominio D de SpA, y la molécula Fcγ. En este modelo ternario, Fab y Fcγ forman una estructura tipo sándwich alrededor de caras opuestas de la hélice II sin evidencia de impedimento estérico de ninguna de las interacciones. Estas observaciones ilustran cómo, a pesar de su pequeño tamaño (es decir, 56-61 aa), un dominio de la SpA puede mostrar simultáneamente ambas actividades, lo que explica la evidencia experimental de que las interacciones de Fab con un dominio individual son no-competitivas. Los residuos para la interacción entre SpA-D y Fcγ son Gln-9 y Gln-10.

En contraste, la ocupación de la porción Fc de la IgG en el dominio D bloquea su interacción con el vWF A1 y probablemente también el TNFR1 (O'Seaghdha *et al.*, 2006). Las mutaciones en los residuos esenciales para la unión a Fc de la IgG (F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, I31 y K35) también se requieren para la unión al vWF A1 y al TNFR1 (O'Seaghdha *et al.*, 2006; Cedergren *et al.*, 1993; Gomez *et al.*, 2006), mientras que los residuos de vital importancia para la interacción con VH3 (Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, E47) no tienen impacto alguno en las actividades de unión de la Fc, el vWF A1 o el TNFR1 de la IgG (Jansson *et al.*, 1998; Graille *et al.*, 2000). La actividad de unión a Fab de la inmunoglobulina de la proteína A establece como diana un subconjunto de linfocitos B que expresan IgM relacionado con la familia V_H3 en su superficie, es decir, estas moléculas funcionan como receptores de linfocitos B de tipo VH3 (Roben *et al.*, 1995). Ante la interacción con la SpA, estos linfocitos B proliferan rápidamente y a continuación se destinan a la apoptosis, lo que conduce a una delección preferencial y prolongada de los linfocitos B de tipo innato (es decir, linfocitos B de la zona marginal y linfocitos B2 foliculares) (Goodyear y Silverman, 2004; Goodyear y Silverman, 2003). Más del 40% de los linfocitos B circulantes son la diana de la interacción de la proteína A, y la familia V_H3 representa la familia más grande de receptores de linfocitos B humanos que imparten respuestas humores protectoras contra patógenos (Goodyear y Silverman, 2004; Goodyear y Silverman, 2003). Por tanto, la proteína A funciona de forma análoga a los superantígenos estafilocócicos (Roben *et al.*, 1995), a pesar de que esta última clase de moléculas, por ejemplo, SEB, TSST-1, TSST-2, forman complejos con el receptor de linfocitos T para estimular inadecuadamente las respuestas inmunes del huésped y provocando de ese modo características de enfermedad típicas de las infecciones estafilocócicas (Roben *et al.*, 1995; Tiedemann *et al.*, 1995). Estas observaciones en conjunto documentan las contribuciones de la proteína A en cuanto a establecer infecciones estafilocócicas y modular las respuestas inmunes del huésped.

En resumen, puede verse que los dominios de la proteína A muestran dos interfaces diferentes para la unión con moléculas hospedadoras, y cualquier desarrollo de vacunas a base de proteína A debe considerar la generación de variantes que no perturben la señalización de la célula hospedadora, la agregación de plaquetas, secuestro de inmunoglobulinas o la inducción de la proliferación y apoptosis de linfocitos B. Tales variantes de la proteína A deberían además ser de utilidad a la hora de analizar las vacunas para determinar la capacidad de generar anticuerpos que bloqueen las actividades de la SpA mencionadas anteriormente y ocupar los cinco dominios de repetición en sus interfaces de unión doble. Este objeto se expresa y se aplica en la presente por primera vez y se describen en detalle métodos para la generación de variantes de la proteína A que pueden ser utilizados como una vacuna segura para humanos. Para alterar la unión de Fcγ, vWF A1 y TNFR1 a la IgG, se mutaron la glutamina (Q) 9 y la 10 [numeración obtenida a partir del dominio D de la SpA tal como se describe en Uhlen *et al.*, 1984], y se generaron sustituciones de lisina para ambas glutaminas esperando que éstas supriman las propiedades del ligando en la primera interfaz de unión. Para alterar la unión de Fab VH3 a la IgM, se mutaron el aspartato (D) 36 y el 37, cada uno de los cuales se requiere para la asociación con el receptor del linfocito B. El D36 y el D37 fueron ambos sustituidos con alanina. Las mutaciones Q9,10K y D36,37A se combinan aquí en la molécula recombinante SpA-DQ9,10K;-D36,37A y se prueban para determinar las propiedades de unión de la proteína A. Además, las SpA-D y SpA-DQ9,10K;-D36,37A están sujetas a estudios de inmunización en ratones y conejos y se analizan para determinar [1] la producción de anticuerpos específicos (SpA-D Ab); [2] la capacidad de la SpA-D Ab de bloquear la asociación entre la proteína A y sus cuatro ligandos diferentes; y, [3] las propiedades de la SpA-D Ab para generar inmunidad protectora contra infecciones estafilocócicas. (Ver la sección de Ejemplos más adelante).

B. Coagulasas estafilocócicas

Las coagulasas son enzimas producidas por bacterias *Staphylococcus* que convierten el fibrinógeno en fibrina. La Coa y vW_H activan la protrombina si proteólisis (Friedrich *et al.*, 2003). El complejo coagulasa-protrombina reconoce el fibrinógeno como un sustrato específico, convirtiéndolo directamente en fibrina. La estructura cristalina del complejo activo reveló las uniones de los dominios D1 y D2 a la protrombina y la inserción de su Ile1-Val² N-terminal en la cavidad Ile¹⁶, lo que induce un sitio activo funcional en el zimógeno a través de un cambio conformacional (Friedrich *et al.*, 2003). El exosito I de la α -trombina, el sitio de reconocimiento del fibrinógeno, y el proexosito I en la protrombina son bloqueados por el D2 de la Coa (Friedrich *et al.*, 2003). No obstante, la asociación del complejo tetramérico (Coa-protrombina)₂ se une al fibrinógeno en un nuevo sitio con una elevada afinidad (Panizzi *et al.*, 2006). Este modelo explica las propiedades coagulantes y la eficaz conversión del fibrinógeno por parte de la coagulasa (Panizzi *et al.*, 2006).

El fibrinógeno es una glicoproteína grande (Mr ~340.000), formada por tres pares de cadenas A α -, B β -, y γ -enlazadas de forma covalente para formar un "dímero de trímeros", donde A y B designan los fibrinopéptidos liberados por el corte de trombina (Panizzi *et al.*, 2006). La molécula alargada se pliega en tres dominios separados, un fragmento E central que contiene los extremos N-terminal de todas las seis cadenas y dos fragmentos D flanqueadores formados principalmente por los extremos C-terminal de las cadenas B β - y γ -. Estos dominios globulares están conectados por estructuras helicoidales triples grandes. Los complejos de coagulasa-protrombina, que convierten el fibrinógeno humano en la fibrina autopolimerizante, no son la diana de los inhibidores de trombina circulante (Panizzi *et al.*, 2006). Por tanto, las coagulasas estafilocócicas se desvían de la vía fisiológica de coagulación de la sangre.

Todas las cepas de *S. aureus* secretan coagulasa y vWbp (Bjerketorp *et al.*, 2004; Field y Smith, 1945). Aunque en trabajos previos se describían importantes contribuciones de la coagulasa a la patogénesis de las infecciones estafilocócicas (Ekstedt y Yotis, 1960; Smith *et al.*, 1947), investigaciones más recientes con herramientas de genética molecular retrasaron este punto de vista observando fenotipos sin virulencia con modelos de endocarditis, abscesos de la piel y mastitis en ratones (Moreillon *et al.*, 1995; Phonimdaeng *et al.*, 1990). Generando variantes isogénicas de *S. aureus* Newman, un aislado clínico completamente virulento (Duthie *et al.*, 1952), se describe en la presente patente que los mutantes de coa de hecho muestran defectos de virulencia en un modelo de bacteriemia letal y absceso renal en ratones. Bajo la experiencia de los inventores, el *S. aureus* 8325-4 no es completamente virulento, y se presupone que las lesiones mutágenas en esta cepa pueden no ser capaces de revelar defectos de virulencia *in vivo*. Más aún, los anticuerpos generados contra la Coa o el vWbp alteran la patogénesis de las infecciones por *S. aureus* Newman hasta el grado de ser un reflejo del impacto de las delecciones de genes. Coa y vWbp contribuyen a la formación de abscesos estafilocócicos y bacteriemia letal y pueden funcionar como antígenos protectores en vacunas subunitarias.

Estudios bioquímicos documentan el valor biológico de los anticuerpos contra Coa y vWbp. Uniéndose al antígeno y bloqueando su asociación con factores de coagulación, los anticuerpos evitan la formación de complejos Coa-protrombina y vWbp-protrombina. Estudios de transferencia pasiva revelaron la protección de animales experimentales contra la formación de abscesos estafilocócicos y la prueba de provocación letal mediante anticuerpos de Coa y vWbp. Por tanto, los anticuerpos que neutralizan Coa y vWbp generan protección inmune contra la enfermedad estafilocócica.

Estudios anteriores revelaron la necesidad de coagulasa para resistir la fagocitosis en sangre (Smith *et al.*, 1947) y los inventores observaron un fenotipo similar para los mutantes de Δ coa en sangre de ratón tratada con lepirudina (ver Ejemplo 3 más adelante). Debido a que el vWbp presenta una mayor afinidad con la protrombina humana que su equivalente en ratones, se sospecha que puede ocurrir lo mismo para las variantes de Δ vWbp en la sangre humana. Además, la expresión de Coa y vWbp en lesiones de abscesos, además de su sorprendente distribución en la pseudocápsula eosinofílica que le rodea (las comunidades de abscesos estafilocócicos (SACs) o la pared de fibrina periférica, sugieren que las coagulasas secretadas contribuyen al establecimiento de estas lesiones. Esta hipótesis se sometió a prueba y, de hecho, los mutantes de Δ coa resultaron defectuosos en el establecimiento de abscesos. Una prueba correspondiente, bloqueando la función de la Coa con anticuerpos específicos, produjo el mismo efecto. En consecuencia, se propone que la coagulación de la fibrina es un hecho de vital importancia en el establecimiento de abscesos estafilocócicos que puede establecerse como diana para el desarrollo de vacunas protectoras. Debido a su función de superposición en la protrombina humana, tanto la Coa como el vWbp se consideran candidatos excelentes para el desarrollo de vacunas.

C. Otros antígenos estafilocócicos

Las investigaciones a lo largo de diversas décadas pasadas han identificado las exotoxinas de *S. aureus*, las proteínas de superficie y las moléculas reguladoras como importantes factores de virulencia (Foster, 2005; Mazmanian *et al.*, 2001; Novick, 2003). Se ha logrado un gran avance en cuanto a la regulación de estos genes. Por ejemplo, los estafilococos llevan a cabo un censo bacteriano a través de la secreción de péptidos autoinductores que se unen a un receptor afín en una concentración umbral, activando de ese modo una reacción phosphorelay

(reacciones múltiples de fosfotransferencia) y la activación de la transcripción de muchos de los genes de la exotoxina (Novick, 2003). La patogénesis de las infecciones estafilocócicas se basa en estos factores de virulencia (exotoxinas secretadas, exopolisacáridos y adhesinas de superficie). El desarrollo de vacunas estafilocócicas se ve dificultado por la naturaleza multifacética de los mecanismos de invasión estafilocócica. Está bien establecido que los micro-organismos vivos atenuados son vacunas sumamente efectivas; las respuestas inmunes provocadas por tales vacunas son a menudo de mayor magnitud y de mayor duración que las producidas por inmunógenos no replicantes. Una explicación para este hecho puede ser que las cepas vivas atenuadas establecen infecciones limitadas en el huésped e imitan los estados tempranos de la infección natural. Las realizaciones de la invención están dirigidas a composiciones y métodos que incluyen polipéptidos y péptidos de la variante de SpA, además de otras proteínas, polipéptidos y péptidos extracelulares inmunogénicos (incluyendo tanto péptidos o proteínas secretadas como de la superficie celular), de bacterias gram positivas para su uso en la mitigación o inmunización contra la infección. En modos de realización en particular la bacteria es una bacteria estafilococo. Las proteínas, polipéptidos o péptidos extracelulares, incluyen, pero no se limitan a, proteínas secretadas y de la superficie celular de las bacterias establecidas como diana.

El patógeno humano *S. aureus* secreta EsxA y EsxB, dos proteínas similares a ESAT-6, a través de la envoltura bacteriana (Burts *et al.*, 2005, que se incorpora en la presente patente a modo de referencia). Las esxA y esxB estafilocócicas se agrupan con otros seis genes en el orden de transcripción: esxA esaA essA esaB essB essC esaC esxB. Los acrónimos esa, ess, y esx representan accesorios de secreción, sistema de secreción o secreción extracelular de ESAT-6, respectivamente, dependiendo de si las proteínas codificadas juegan un papel accesorio (esa) o directo (ess) para la secreción, o si son segregadas en un el medio extracelular (esx). En la presente patente se hace referencia al grupo entero de ocho genes como el grupo Ess. EsxA, esxB, esaA, esaB, y esaC son todos necesarios para la síntesis o secreción de EsxA y EsxB. Los mutantes que no producen EsxA, EsxB, y EssC presentan defectos en al patogénesis de abscesos murinos de *S. aureus*, lo que sugiere que este sistema de secreción especializado puede ser una estrategia general de la patogénesis bacteriana humana. Se ha descrito la secreción de sustratos no-WXG100 por parte de la vía de ESX-1 para diversos antígenos incluyendo EspA, EspB, Rv3483c, y Rv3615c (Fortune *et al.*, 2005; MacGurn *et al.*, 2005; McLaughlin *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007). También se ha mostrado que la vía alternativa de ESX-5 secreta tanto proteínas WXG100 como no-WXG100 en micobacterias patogénicas (Abdallah *et al.*, 2007; Abdallah *et al.*, 2006).

La vía Ess del *Staphylococcus aureus* puede verse como un módulo de secreción equipado con componentes de transporte especializados (Ess), factores accesorios (Esa) y sustratos de secreción afines (Esx). EssA, EssB y EssC se requieren para la secreción de EsxA y EsxB. De bido a que se prevé que son proteínas transmembrana, se contempla que estas proteínas forman un aparato de secreción. Algunas de las proteínas en este grupo de genes ess pueden transportar de forma activa sustratos segregados (actuando como un motor) mientras que otras pueden regular el transporte (regulador). La regulación puede lograrse, pero sin necesidad de estar limitado a ello, mediante mecanismos de transcripción o post-traducción para polipéptidos secretados, clasificación de sustratos específicos para localizaciones definidas (por ejemplo, medio extracelular o células hospedadoras), o seguimiento del tiempo de los eventos de secreción durante la infección. En este punto, no está claro si todas las proteínas Esx secretadas funcionan como toxinas o contribuyen indirectamente a la patogénesis.

Los estafilococos dependen de la adhesión mediada por las proteínas de superficie a las células hospedadoras o de la invasión de tejidos como una estrategia para escapar de las defensas inmunes. Además, el *S. aureus* utiliza las proteínas de superficie para secuestrar hierro del huésped durante la infección. La mayoría de las proteínas de superficie implicadas en la patogénesis estafilocócica portan señales de clasificación C-terminales, es decir, están enlazadas de forma covalente a la envoltura de la pared celular mediante la sortasa. Además, las cepas estafilocócicas que carecen de los genes requeridos para el anclaje de las proteínas de superficie, es decir, sortasa A y B, presentan una espectacular deficiencia de virulencia en diversos modelos diferentes de enfermedad en ratón. Por tanto, los antígenos de las proteínas de superficie representan una diana para vacuna validada, ya que los genes correspondientes son esenciales para el desarrollo de la enfermedad estafilocócica y pueden ser explotados en diversos modos de realización de la invención. La superfamilia sortasa de enzimas son transpeptidasas gram-positivas responsables del anclaje de los factores de virulencia de las proteínas de superficie a la capa del peptidoglicano de la pared celular. Se han identificado dos isoformas de la sortasa en el *Staphylococcus aureus*, la SrtA y SrtB. Se ha mostrado que estas enzimas reconocen el motivo LPXTG en las proteínas sustrato. La isoforma SrtB parece ser importante en la adquisición del hierro hémico y la homeostasis del hierro, mientras que la isoforma SrtA juega un papel de vital importancia en la patogénesis de las bacterias gram-positivas modulando la capacidad de la bacteria para adherirse al tejido del huésped a través del anclaje covalente de adhesinas y otras proteínas a al peptidoglicano de la pared celular. En determinados modos de realización las variantes de SpA descritas en la presente patente pueden ser utilizadas en combinación con otras proteínas estafilocócicas tales como las proteínas Coa, Eap, Ebh, Emp, EsaC, EsaB, EsxA, EsxB, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, IsdC, SasF, vWbp, y/o vWh.

Determinados aspectos de la invención incluyen métodos y composiciones en referencia a composiciones proteicas que incluyen polipéptidos, péptidos o ácidos nucleicos que codifican una variante o variantes de SpA y otros

antígenos estafilocócicos tales como otras proteínas transportadas por la vía Ess, o sustratos de sortasa. Estas proteínas pueden ser modificadas por delección, inserción, y/o sustitución.

Los polipéptidos Esx incluyen la secuencia de aminoácidos de las proteínas Esx de las bacterias en el género *Staphylococcus* genus. La secuencia Esx puede ser de una especie de estafilococo en particular, tal como el *Staphylococcus aureus*, y puede proceder de una cepa en particular, tal como por ejemplo la Newman. En determinadas realizaciones, la secuencia de EsxA es SAV0282 de la cepa Mu50 (que es la misma secuencia de aminoácidos para Newman) y se puede acceder a la misma utilizando el Número de Acceso del Genbank Q99WU4 (gi|68565539). En otras realizaciones, la secuencia de EsxB es SAV0290 de la cepa Mu50 (que es la misma secuencia de aminoácidos para Newman) y se puede acceder a la misma utilizando el Número de Acceso del Genbank Q99WT7 (gi|68565532). En realizaciones adicionales, pueden utilizarse otros polipéptidos transportados por la vía Ess, las secuencias de las cuales pueden ser identificadas por un experto en el arte utilizando bases de datos y recursos accesibles a través de Internet.

Los polipéptidos sustrato de la sortasa incluyen, pero no se limitan a, la secuencia de aminoácidos de las proteínas SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, ClfA, ClfB, IsdC o SasF de las bacterias en el género *Staphylococcus*. La secuencia del polipéptido sustrato de la sortasa puede ser de una especie de *staphylococcus* en particular, tal como el *Staphylococcus aureus*, y puede proceder de una cepa en particular, tal como por ejemplo la Newman. En determinadas realizaciones, la secuencia de SdrD procede de la cepa N315 y se puede acceder a la misma utilizando el Número de Acceso del Genbank NP_373773.1 (gi|15926240). En determinadas realizaciones, la secuencia de SdrE procede de la cepa N315 y se puede acceder a la misma utilizando el Número de Acceso del Genbank NP_373774.1 (gi|15926241). En determinadas realizaciones, la secuencia de IsdA es SAV1130 de la cepa Mu50 (que es la misma secuencia de aminoácidos para Newman) y se puede acceder a la misma utilizando el Número de Acceso del Genbank NP_371654.1 (gi|15924120). En otras realizaciones, la secuencia de IsdB es SAV1129 de la cepa Mu50 (que es la misma secuencia de aminoácidos para Newman) y se puede acceder a la misma utilizando el Número de Acceso del Genbank NP_371653.1 (gi|15924119). En realizaciones adicionales, pueden utilizarse otros polipéptidos transportados por la vía Ess o procesados por la sortasa, cuyas secuencias pueden ser identificadas por un experto en el arte utilizando bases de datos y recursos accesibles a través de internet.

Pueden identificarse ejemplos de diversas proteínas que pueden utilizarse en el contexto de la presente invención mediante el análisis de los registros de bases de datos de genomas bacterianos, incluyendo pero sin limitarse a, los números de acceso NC_002951 (GI:57650036, y CP000046 de GenBank), NC_002758 (GI:57634611, y BA000017 de GenBank), NC_002745 (GI:29165615, y BA000018 de GenBank), NC_003923 (GI:21281729, y BA000033 de GenBank), NC_002952 (GI:49482253, y BX571856 de GenBank), NC_002953 (GI:49484912, y BX571857 de GenBank), NC_007793 (GI:87125858, y CP000255 de GenBank), NC_007795 (GI:87201381, y CP000253 de GenBank).

Tal como se utiliza en la presente patente, una "proteína" o "polipéptido" hace referencia a una molécula que comprende al menos diez residuos de aminoácidos. En algunas realizaciones, se emplea una versión de tipo silvestre de una proteína o polipéptido, sin embargo, en muchas realizaciones de la invención se emplea una proteína o polipéptido modificados para generar una respuesta inmune. Los términos descritos anteriormente pueden ser utilizados indistintamente. Una "proteína modificada" o "un polipéptido modificado" o una "variante" hacen referencia a una proteína o polipéptido cuya estructura química, en particular su secuencia de aminoácidos, se encuentra alterada con respecto a la proteína o polipéptido de tipo silvestre. En algunas realizaciones, una proteína o polipéptido modificado/variante tiene al menos una actividad o función modificada (reconociendo que las proteínas o los polipéptidos pueden tener múltiples actividades o funciones). Se contempla específicamente que una proteína o polipéptido modificado/variante puede estar alterado con respecto a una actividad o función y aun así mantener una actividad o función de tipo silvestre en otros aspectos, tal como la inmunogenicidad.

En determinadas realizaciones el tamaño de una proteína o polipéptido (de tipo silvestre o modificado) puede comprender, pero no está limitado a, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 moléculas amino o más, y cualquier rango que pueda obtenerse en las mismas, o derivado de una secuencia de aminoácidos correspondiente descrita o referenciada en la presente patente. Se contempla que los polipéptidos pueden ser mutados por truncamiento, haciéndolas más pequeñas que su forma de tipo silvestre correspondiente, pero además podrían ser alteradas fusionando o conjugando una secuencia de proteínas heteróloga con una función en particular (por ejemplo, para su fijación como diana o localización, para el aumento de inmunogenicidad, para propósitos de purificación, etc.).

Tal como se utiliza en la presente patente, una “amino molécula”, hace referencia a cualquier aminoácido, derivado de aminoácidos, o imitador de aminoácidos conocido en el arte. En determinadas realizaciones, los residuos de la molécula proteica son secuenciales, sin que ninguna molécula interrumpa la secuencia de los residuos de la amino molécula. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender una o más fracciones de moléculas no amino. En realizaciones en particular, la secuencia de residuos de la molécula proteica puede ser interrumpida por una o más fracciones de moléculas no amino.

Por consiguiente, el término “composición proteica” abarca secuencias de amino moléculas que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes en las proteínas sintetizadas naturalmente, o al menos un aminoácido modificado o no habitual.

Las composiciones proteicas pueden realizarse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en el arte, incluyendo (i) la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas biológicas moleculares estándar, (ii) el aislamiento de compuestos proteicos a partir de fuentes naturales, o (iii) la síntesis química de materiales proteicos. Se han revelado las secuencias de nucleótidos además de las de proteínas, polipéptidos y péptidos para varios genes, y pueden encontrarse en bases de datos informatizadas reconocidas. Una base de datos de este tipo es la base de datos Genbank y la GenPept del “National Center for Biotechnology Information” (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) (en la World Wide Web en la dirección ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones de codificación para estos genes pueden ser amplificadas y/o expresadas utilizando las técnicas reveladas en la presente patente o como será conocido para los expertos de práctica habitual en el arte.

Las variantes de la secuencia de aminoácidos de SpA, coagulasas y otros polipéptidos de la invención pueden ser variantes sustitutivas, insercionales, o de delección. Una variación en un polipéptido de la invención puede afectar a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, o más aminoácidos contiguos o no contiguos del polipéptido, en comparación con el tipo silvestre. Una variante puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%, incluyendo todos los valores y rango entre los mismos, idéntica a cualquier secuencia proporcionada o referenciada en la presente patente, por ejemplo, SEQ ID NO:2-8 o SEQ ID NO:11-30. Una variante puede incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más aminoácidos sustitutos. Se contemplan para su uso en las composiciones y métodos descritos en la presente patente, un polipéptido procesado o secretado por la vía Ess o por otras proteínas de superficie (ver Tabla 1) o sustratos de sortasa de cualquier especie y cepa de *staphylococcus*.

Las variantes de delección carecen habitualmente de uno o más residuos de la proteína nativa o de tipo silvestre. Pueden eliminarse los residuos individuales, o pueden eliminarse un número de aminoácidos contiguos. Puede introducirse un codón de terminación (mediante sustitución o inserción) en una secuencia de ácido nucleico de codificación para generar una proteína truncada. Los mutantes insercionales implican habitualmente la adición de material en un punto no terminal en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de uno o más residuos. Pueden también generarse adiciones terminales, denominadas proteínas de fusión. Estas proteínas de fusión incluyen multímeros o concatámeros de uno o más péptidos o polipéptidos descritos o referenciados en la presente patente.

Las variantes sustitutivas habitualmente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido, con o sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones pueden ser conservadoras, es decir, un aminoácido se reemplaza con otro de forma y carga similar. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas en el arte e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina por serina; arginina por lisina; asparagina por glutamina o histidina; aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparagina; glutamato por aspartato; glicina por prolina; histidina por asparagina o glutamina; isoleucina por leucina o valina; leucina por valina o isoleucina; lisina por arginina; metionina por leucina o isoleucina; fenilalanina por tirosina, leucina o metionina; serina por treonina; treonina por serina; triptófano por tirosina; tirosina por triptófano o fenilalanina; y valina por isoleucina o leucina. De manera alternativa, las sustituciones pueden no ser conservadoras de tal manera que se ve afectada una función o actividad del polipéptido. Los cambios no conservadores implican habitualmente la sustitución de un residuo con uno que sea químicamente no similar, tal como un aminoácido polar o con carga por un aminoácido no polar o sin carga, y vice versa.

Tabla 1. Ejemplos de proteínas de superficie de cepas de *S. aureus*

SAV#	De SA#	Superficie	MW2	Mu50	N315	Newman	MRSA252*	MSSA476*
SAV0111	SA0107	Spa	492	450	450	520	516	492
SAV2503	SA2291	FnBPA	1015	1038	1038	741	-	1015
SAV2502	SA2290	FnBPB	943	961	961	677	965	957

SAV#	De SA#	Superficie	MW2	Mu50	N315	Newman	MRSA252*	MSSA476*
SAV0811	SA0742	ClfA	946	935	989	933	1029	928
SAV2630	SA2423	ClfB	907	877	877	913	873	905
Np	Np	Cna	1183	-	-	-	1183	1183
SAV0561	SA0519	SdrC	955	953	953	947	906	957
SAV0562	SA0520	SdrD	1347	1385	1385	1315	-	1365
SAV0563	SA0521	SdrE	1141	1141	1141	1166	1137	1141
Np	Np	Pls	-	-	-	-	-	-
SAV2654	SA2447	SasA	2275	2271	2271	2271	1351	2275
SAV2160	SA1964	SasB	686	2481	2481	2481	2222	685
	SA1577	SasC	2186	213	2186	2186	2189	2186
SAV0134	SA0129	SasD	241	241	241	241	221	241
SAV1130	SA0977	SasE/IsdA	350	350	350	350	354	350
SAV2646	SA2439	SasF	635	635	635	635	627	635
SAV2496		SasG	1371	525	927	-	-	1371
SAV0023	SA0022	SasH	722	-	772	772	786	786
SAV1731	SA1552	SasI	895	891	891	891	534	895
SAV1129	SA0976	SasJ/IsdB	645	645	645	645	652	645
	SA2381	SasK	198	211	211	-	.	197
	Np	SasL	-	232	-	-	-	-
SAV1131	SA0978	IsdC	227	227	227	227	227	227

Las proteínas de la invención pueden ser recombinantes, o sintetizarse *in vitro*. De manera alternativa, una proteína no recombinante o recombinante puede ser aislada de una bacteria. También se contempla que una bacteria que contiene una variante de este tipo pueda ser implementada en composiciones y métodos de la invención. Consecuentemente, una proteína no necesita ser aislada.

5

El término “codón funcionalmente equivalente” se utiliza en la presente patente para hacer referencia a codones que codifican el mismo aminoácido, tal como los seis codones para arginina o serina, y también hace referencia a codones que codifican aminoácidos biológicamente equivalentes (ver la Tabla 2, a continuación).

Tabla 2 Tabla de codones

Aminoácidos	Codones
Alanina Ala A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína Cys C	UGC UGU
Ácido asoártico Asp D	GAC GAU
Ácido glutámico Glu E	GAA GAG
Fenilalanina Phe F	UUC UUU
Glicina Gly G	GGA GGC GGG GGU
Histidina His H	CAC CAU
Isoleucina Ile I	AUA AUC AUU
Lisina Lys K	AAA AAG
Leucina Leu L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU

Aminoácidos		Codones
Metionina Met	M	AUG
Asparagina Asn	N	AAC AAU
Prolina Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina Gln	Q	CAA CAG
Arginina Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valina Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano Trp	W	UGG
Tirosina Tyr	Y	UAC UAU

Se debe entender que las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos pueden incluir residuos adicionales, tales como aminoácidos N- o C-terminales adicionales, o secuencias del extremo 5' o 3', respectivamente, y aun así seguir siendo esencialmente tal como se muestra en una de las secuencias reveladas en la presente patente, siempre que la secuencia cumpla con los criterios establecidos anteriormente, incluyendo mantener la actividad biológica de la proteína (por ejemplo, la inmunogenicidad) en lo que a la expresión de proteínas se refiere. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a las secuencias de ácidos nucleicos que pueden, por ejemplo, incluir diversas secuencias no codificantes que flanquean la porción 5' o la 3' de la región de codificación.

Lo siguiente es una discusión basada en el cambio de aminoácidos de una proteína para crear un polipéptido o péptido variante. Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura proteica con o sin apreciar pérdida de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión al antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas sustrato. Ya que es la capacidad y naturaleza interactiva de una proteína lo que define esa actividad funcional de la proteína, pueden realizarse ciertas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteínas, y en su secuencia de codificación de ADN subyacente, y no obstante producir una proteína con una propiedad deseable. Se contempla, por tanto, por parte de los inventores que pueden realizarse diversos cambios en las secuencias de ADN de los genes.

Se contempla que en las composiciones de la invención, haya entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 10 mg de polipéptido, péptido y/o proteína total por ml. La concentración de la proteína en una composición puede ser de aproximadamente, al menos, aproximadamente o como máximo aproximadamente 0,001, 0,010, 0,050, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 mg/ml o más (o cualquier rango que pueda obtenerse entre los mismos). De esto, aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% puede ser una variante de SpA o una coagulasa, y puede ser utilizada en combinación con otros péptidos o polipéptidos, tales como otros péptidos bacterianos y/o antígenos.

La presente invención contempla la administración de los péptidos o polipéptidos de la Variante de SpA para efectuar una terapia preventiva o efecto terapéutico contra el desarrollo de una enfermedad o condición asociada con una infección por un patógeno estafilococo.

En ciertos aspectos, las combinaciones de antígenos estafilocócicos se utilizan en la producción de una composición inmunogénica que sea efectiva en el tratamiento o prevención de infecciones estafilocócicas. Las infecciones estafilocócicas se desarrollan a través de diversas etapas diferentes. Por ejemplo, el ciclo de vida estafilocócico implica la colonización de comensales, la iniciación de la infección accediendo a tejidos anexos o al torrente sanguíneo, y/o la multiplicación anaeróbica en la sangre. La interacción entre los determinantes de virulencia del *S. aureus* y los mecanismos de defensa del huésped puede inducir complicaciones tales como endocarditis, formación de abscesos metastásica y síndrome de sepsis. Las diferentes moléculas en la superficie de la bacteria están implicadas en diferentes etapas del ciclo de infección. Las combinaciones de ciertos antígenos pueden provocar una respuesta inmune que protege contra múltiples etapas de la infección estafilocócica. La efectividad de la respuesta inmune puede medirse en ensayos en animales y/o utilizando un ensayo opsonofagocítico.

D. Polipéptidos y producción de polipéptidos

La presente invención describe polipéptidos, péptidos, y proteínas y fragmentos inmunogénicos de los mismos para su uso en diversas realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, los polipéptidos específicos se someten a ensayo para determinar o se utilizan para provocar una respuesta inmune. En realizaciones específicas, todas o parte de las proteínas de la invención pueden también ser sintetizadas en solución o en un soporte sólido de acuerdo con técnicas convencionales. Se encuentran comercialmente disponibles diversos sintetizadores automáticos y pueden ser utilizados de acuerdo con protocolos conocidos. Ver, por ejemplo, Stewart y Young, (1984); Tam *et al.*, (1983); Merrifield, (1986); y Barany y Merrifield (1979).

De manera alternativa, la tecnología de ADN recombinante puede ser empleada en donde una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de la invención se inserta en un vector de expresión, se transforma o transfecta en una célula hospedadora apropiada y se cultiva bajo condiciones adecuadas para la expresión.

Un modo de realización de la invención incluye el uso de la transferencia de genes a las células, incluyendo microorganismos, para la producción y/o presentación de polipéptidos péptidos. El gen para el polipéptido o péptido de interés puede ser transferido a células hospedadoras apropiadas seguido de cultivo de células bajo condiciones apropiadas. La generación de vectores de expresión recombinantes, y los elementos incluidos en los mismos, son bien conocidos en el arte y se discuten brevemente en la presente patente. De forma alternativa, la proteína a ser producida puede ser una proteína endógena sintetizada habitualmente por la célula que es aislada y purificada.

Otro modo de realización de la presente invención utiliza líneas celulares de linfocitos B autólogas, que son transfectadas con un vector vírico que expresa un producto inmunogénico, y más específicamente, una proteína que tiene actividad inmunogénica. Otros ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos incluyen, pero sin limitarse a, células Vero y HeLa, otras líneas celulares B- y T-, tales como CEM, 721.221, H9, Jurkat, Raji, además de líneas celulares de ovario de hámster chino, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN y células MDCK. Además, puede elegirse una cepa de la célula hospedadora que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico de la manera deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, la glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión/corte) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento post-traducción y la modificación de proteínas. Pueden elegirse líneas celulares apropiadas o los sistemas hospedadores para asegurar la correcta modificación y el procesamiento de la proteína extraña expresada.

Puede utilizarse un número de sistemas de selección incluyendo, pero sin limitarse a, la timidina quinasa del HSV, hipoxantineguanina fosforibosiltransferasa, y genes de adenina fosforibosiltransferasa, en células tk-, hgp^rt- o apt^r-, respectivamente. Además, puede utilizarse la resistencia anti-metabolitos como la base de la selección: para dhfr, que confiere resistencia a la trimetoprima y metotrexato; gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G418; e hyg^r, que confiere la resistencia a higromicina.

Las células animales pueden propagarse *in vitro* de dos maneras: como células no dependientes del anclaje que se cultivan en suspensión a través del volumen del cultivo, o como células dependientes del anclaje que requieren la fijación a un sustrato sólido para su propagación (es decir, un crecimiento celular de tipo monocapa).

Los cultivos en suspensión o no dependientes del anclaje a partir de líneas celulares continuas establecidas son el medio más ampliamente utilizado de producción a gran escala de células y productos celulares. Sin embargo, las células cultivadas en suspensión tienen limitaciones, tales como el potencial tumorigénico y una producción de proteínas menor que las células adherentes.

En los casos en que una proteína es específicamente mencionada en la presente patente, es preferiblemente una referencia a una proteína recombinante o nativa, o de manera opcional una proteína en la que cualquier secuencia señal ha sido eliminada. La proteína puede ser aislada directamente de la cepa estafilocócica o producida mediante técnicas de ADN recombinante. Pueden incorporarse fragmentos inmunogénicos en la composición inmunogénica de la invención. Estos son fragmentos que comprenden al menos 10 aminoácidos, 20 aminoácidos, 30 aminoácidos, 40 aminoácidos, 50 aminoácidos, o 100 aminoácidos, incluyendo todos los valores y rangos entre los mismos, tomados de forma continua a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Además, tales fragmentos inmunogénicos son inmunológicamente reactivos con anticuerpos generados contra las proteínas estafilocócicas o con anticuerpos generados por la infección de un huésped mamífero con estafilococos. Los fragmentos inmunogénicos también incluyen fragmentos que cuando se administran en una dosis efectiva, (ya sean solos o como un hapteno enlazado a un soporte), provocan una respuesta inmune protectora o terapéutica contra una infección estafilocócica, en ciertos aspectos es protectora contra una infección con *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. Un fragmento inmunogénico de este tipo puede incluir, por ejemplo, la proteína que carece de una secuencia líder N-terminal, y/o un dominio transmembrana y/o un dominio de anclaje C-terminal. En un aspecto preferido, el fragmento inmunogénico según la invención comprende sustancialmente todo el dominio extracelular de una proteína que tiene al menos un 80% de identidad, al menos un 85% de identidad, al menos un 90% de identidad, al menos un 95% de

identidad, o al menos un 97-99% de identidad, incluyendo todos los valores y rangos entre los mismos, con el segmento de la secuencia de un polipéptido descrito o referenciado en la presente patente.

También incluidas en las composiciones inmunogénicas de la invención, se encuentran las proteínas de fusión compuestas de una o más proteínas estafilocócicas, o fragmentos inmunogénicos de proteínas estafilocócicas. Tales proteínas de fusión pueden ser realizadas de manera recombinante y pueden comprender una porción de al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 proteínas o segmentos estafilocócicos. De manera alternativa, una proteína de fusión puede comprender múltiples porciones de al menos 1, 2, 3, 4 o 5 proteínas estafilocócicas. Estas pueden combinar diferentes proteínas estafilocócicas y/o múltiples de la misma proteína o fragmento de proteína, o fragmentos inmunogénicos en la misma proteína (formando un multímero o concatámero). De manera alternativa, la invención además incluye proteínas de fusión individuales de proteínas estafilocócicas o fragmentos inmunogénicos de las mismas, como una proteína de fusión con secuencias heterólogas tales como un proveedor de epítomos de linfocitos T o etiquetas de purificación, por ejemplo: β -galactosidasa, glutatión-S-transferasa, proteínas verdes fluorescentes (GFP), etiquetas de epítomos tales como FLAG, etiqueta myc, poli histidina, o proteínas de superficie víricas tales como el hemaglutinina del virus de la influenza, o proteínas bacteriana tales como el toxoide tetánico, toxoide diftérico, o el CRM197.

IV. Ácidos nucleicos

En ciertos modos de realización, la presente invención hace referencia a polinucleótidos recombinantes que codifican las proteínas, polipéptidos, péptidos de la invención. Se incluyen las secuencias de ácido nucleico para la SpA, coagulasa y otras proteínas bacterianas, y pueden utilizarse para preparar péptidos o polipéptidos.

Tal como se utiliza en esta solicitud, el término "polinucleótido" hace referencia a una molécula de ácido nucleico que es recombinante o que ha sido aislada libre de ácido nucleico genómico total. El término "polinucleótido" incluye oligonucleótidos (ácidos nucleicos de 100 residuos o menos de longitud), vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus, y similares. Los polinucleótidos incluyen, en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, aisladas sustancialmente de sus genes de origen natural o secuencias de codificación de proteínas. Los polinucleótidos pueden ser de cadena única (de codificación o antisentido) o de doble cadena, y puede ser ARN, ADN (genómico, ADNc o sintético), análogos de los mismos, o una combinación de los mismos. Las secuencias de codificación o no codificación pueden, pero no necesitan, estar presentes dentro de un polinucleótido.

A este respecto, el término "gen", "polinucleótido" o "ácido nucleico" se utiliza para hacer referencia a un ácido nucleico que codifica una proteína, polipéptido, o péptido (incluyendo cualquier secuencia requerida para una transcripción apropiada, una modificación post-traducción, o localización). Tal como se entenderá por los expertos en el arte, este término abarca secuencias genómicas, casetes de expresión, secuencias de ADNc, y segmentos de ácido nucleico modificados por ingeniería genética más pequeños que expresan, o pueden ser adaptados para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión, y mutantes. Un ácido nucleico que codifica parte o la totalidad de un polipéptido puede contener una secuencia de ácido nucleico contigua de: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000, o más nucleótidos, nucleósidos, o pares de bases, incluyendo todos los valores y rangos entre los mismos, de un polinucleótido que codifica uno o más secuencias de aminoácidos descritas o referenciadas en la presente patente. Se contempla que un polipéptido en particular puede ser codificado por ácidos nucleicos que contienen variaciones que presentan secuencias de ácido nucleico ligeramente diferentes pero, aun así, codificar la misma proteína o una sustancialmente similar (ver la Tabla 2 anterior).

En realizaciones en particular, la invención hace referencia a segmentos de ácido nucleico aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ácido nucleico que codifican la Variante de SpA. El término "recombinante" puede ser utilizado en conjunto con un polinucleótido o polipéptido y generalmente hace referencia a un polipéptido o polinucleótido producido y/o manipulado *in vitro* o que es un producto de replicación de una molécula de ese tipo.

En otros modos de realización, la invención hace referencia a segmentos de ácido nucleico aislados y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos o péptidos de Variante de SpA para generar una respuesta inmune en un sujeto. En diversas realizaciones los ácidos nucleicos de la invención pueden ser utilizados en vacunas genéticas.

Los segmentos de ácido nucleico utilizados en la presente invención pueden combinarse con otras secuencias de ácido nucleico, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, múltiples sitios de clonación, otros segmentos de codificación, y similares, de tal manera que su longitud total puede

variar considerablemente. Se contempla, por lo tanto, que un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud puede ser empleado, estando limitada su longitud total preferiblemente por la facilidad de preparación y utilización en el protocolo de ácidos nucleicos recombinantes. En algunos casos, una secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia de polipéptidos con secuencias de codificación heterólogas adicionales, por ejemplo para permitir la purificación del polipéptido, transporte, secreción, modificación post-traducción, o para beneficios terapéuticos tales como el establecimiento de dianas o la eficacia. Tal como se ha discutido anteriormente, puede añadirse una etiqueta u otros polipéptidos heterólogos a la secuencia de codificación del polipéptido modificada, en donde "heteróloga" hace referencia a un polipéptido que no es el mismo que el polipéptido modificado.

En ciertas realizaciones diferentes, la invención hace referencia a segmentos de ácido nucleico aislados y a vectores recombinantes que incluyen dentro de su secuencia una secuencia de ácido nucleico contigua de la SEQ ID NO:1 (dominio D de SpA) o SEQ ID NO:3 (SpA) o cualquier otras secuencias de ácido nucleico que codifica coagulasas u otros factores de virulencia secretados y/o proteínas de superficie, incluyendo proteínas transportadas por la vía Ess, procesada por la sortasa, o proteínas.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona variantes de polinucleótidos que tienen una identidad sustancial con las secuencias reveladas en la presente patente; donde las mismas comprenden al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% o una identidad de secuencia mayor, incluyendo todos los valores y rangos entre los mismos, en comparación con una secuencia de polinucleótidos de esta invención, utilizando los métodos descritos en la presente (por ejemplo, análisis BLAST utilizando parámetros estándar).

La presente invención además contempla el uso de polinucleótidos que son complementarios a todos los polinucleótidos descritos anteriormente.

E. Vectores

Los polipéptidos de la invención pueden ser codificados por una molécula de ácido nucleico comprendida en un vector. El término "vector" se utiliza para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico portadora en la que puede insertarse una secuencia de ácido nucleico para su introducción en una célula donde pueda ser reproducida y expresada. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "heteróloga", lo que significa que se encuentra en un contexto ajeno a la célula en la que el vector está siendo introducida o al ácido nucleico en el que se incorpora, que incluye una secuencia homóloga a una secuencia en la célula o ácido nucleico pero en una posición dentro de la célula hospedadora o ácido nucleico donde no se encuentra normalmente. Los vectores incluyen ADN, ARN, plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales, y virus vegetales), y cromosomas artificiales (por ejemplo, cromosoma artificial de levadura o YAC) Un experto en el arte estaría bien preparado para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándar (por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001; Ausubel *et al.*, 1996, ambos incorporados en la presente patente a modo de referencia). Además de codificar un polipéptido de Variante de SpA, el vector puede codificar otras secuencias de polipéptidos tales como uno o más péptidos bacterianos, una etiqueta, o un péptido de aumento de la inmunogenicidad. Entre los vectores de utilidad que codifican tales proteínas de fusión se incluyen vectores pIN (Inouye *et al.*, 1985), vectores que codifican un tramo de histidinas, y vectores pGEX, para su uso en generar proteínas de fusión solubles de glutatión-S-transferasa (GST) para su purificación y separación o escisión más tarde.

El término "vector de expresión" hace referencia a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico capaz de ser transcrito. En algunos casos, se traducen las moléculas de ARN a una proteína, polipéptido o péptido. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de "secuencias de control", lo que hace referencia a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y la posible traducción de una secuencia de codificación ligada operativamente en un organismo hospedador en particular. Además de controlar las secuencias que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que cumplen otras también funciones y se describen en la presente patente.

1. Promotores y potenciadores

Un "promotor" es una secuencia de control. El promotor es habitualmente una región de una secuencia de ácido nucleico en la cual se controlan la iniciación y la tasa de transcripción. Puede contener elementos genéticos en los que pueden unirse proteínas reguladoras y moléculas tales como la ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Las frases "posicionado operativamente", "ligado operativamente", "bajo control", y "bajo control transcripcional" significan que un promotor se encuentra en una localización y/u orientación funcional correcta en relación a una secuencia de ácido nucleico para controlar la iniciación de la transcripción y la expresión de esa secuencia. Un promotor puede ser o no utilizado en conjunción con un "potenciador", que hace referencia a una secuencia reguladora que actúa en cis- implicada en la activación de la transcripción de una secuencia de ácido nucleico.

Naturalmente, puede ser importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija de forma efectiva la expresión del segmento de ADN en el tipo de célula u organismo elegido para la expresión. Los expertos en el arte de la biología molecular conocen generalmente el uso de promotores, potenciadores, y combinaciones de tipos de células para la expresión de proteínas (ver Sambrook *et al.*, 2001). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos del tejido, o inducibles y en ciertos modos de realización pueden dirigir una expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido bajo condiciones específicas, tal como la producción a gran escala de proteínas o péptidos recombinantes.

Pueden emplearse diversos elementos/promotores en el contexto de la presente invención para regular la expresión de un gen.

No se cree que el promotor en particular que se emplee para controlar la expresión del péptido o proteína que codifica el polinucleótido de la invención sea de mucha importancia, siempre que sea capaz de expresar el polinucleótido en una célula diana, preferiblemente una célula bacteriana. Cuando se fije como diana una célula humana, es preferible situar la región de codificación del polinucleótido adyacente a y bajo el control de un promotor que sea capaz de ser expresado en una célula humana. En términos generales, un promotor de ese tipo podría incluir un promotor bien bacteriano, como humano o vírico.

En realizaciones en las que se administra un vector a un sujeto para la expresión de una proteína, se contempla que un promotor que se desea para su uso con el vector es uno que no se encuentra regulado por disminución por parte de las citoquinas, o uno que es lo suficientemente fuerte de manera que incluso si está regulado por disminución, produce una cantidad efectiva de una Variante de SpA para provocar una respuesta inmune. Ejemplos no limitativos de estos son CMV IE y RSV LTR. Pueden utilizarse promotores específicos de tejidos, particularmente si la expresión es en células en las que la expresión de un antígeno es deseable, tal como por ejemplo células dendríticas o macrófagos. Los promotores MHC I y MHC II de mamíferos son ejemplos de dichos promotores específicos de tejidos.

2. Señales de iniciación y sitios internos de unión al ribosoma (IRES)

Una señal de iniciación específica también puede ser requerida para una traducción eficiente de secuencias de codificación. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales de control de la traducción exógenas, incluyendo el codón de iniciación ATG. Un experto de práctica habitual en el arte sería capaz de determinar esta circunstancia fácilmente y proporcionar las señales necesarias.

En determinadas realizaciones de la invención, el uso de elementos de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) se utilizan para crear mensajes multigénicos o policistrónicos. Los elementos IRES son capaces de evitar el modelo de escaneo ribosómico de la traducción dependiente del Cap metilado del extremo 5' y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988; Macejak and Sarnow, 1991). Los elementos IRES pueden estar ligados a marcos de lectura abiertos heterólogos. Pueden transcribirse juntos múltiples marcos de lectura abiertos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. Pueden expresarse múltiples genes de manera eficaz utilizando un único promotor/potenciador para transcribir un único mensaje (ver las patentes estadounidenses 5,925,565 y 5,935,819).

3. Marcadores que pueden seleccionarse o detectarse

En determinadas realizaciones de la invención, las células que contienen un constructo de ácido nucleico de la presente invención pueden ser identificadas *in vitro* o *in vivo* codificando un marcador que puede seleccionarse o detectarse en el vector de expresión. Cuando se transcribe y se traduce, un marcador confiere un cambio identificable a la célula, lo que permite una fácil identificación de las células que contienen el vector de expresión.

F. Células hospedadoras

Tal como se utiliza en la presente patente, los términos "célula", "línea celular", y "cultivo celular" pueden utilizarse indistintamente. Todos estos términos además incluyen su progenie, que es todas y cada una de las generaciones posteriores. Se debe entender que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. En el contexto de la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga, "célula hospedadora" hace referencia a una célula procariota o eucariota, e incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de reproducir un vector o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula hospedadora puede utilizarse, y ha sido utilizada como receptor para vectores o virus. Una célula hospedadora puede ser "transfectada" o "transformada", lo que hace referencia a un proceso por el cual un ácido nucleico exógeno, tal como una secuencia de codificación de proteínas recombinantes, se transfiere a o se introduce en la célula hospedadora. Una célula transformada incluye al sujeto primario y a su progenie.

Las células hospedadoras pueden obtenerse a partir de células procariotas o eucariotas, incluyendo bacterias, células de levaduras, células de insectos, y células de mamíferos para la replicación del vector de expresión de parte o la totalidad de la secuencia o secuencias de ácido nucleico. Se encuentran disponibles numerosas líneas y cultivos celulares para su uso como una célula hospedadora, y pueden ser obtenidas a través de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, del inglés "American Type Culture Collection"), que es una organización que funciona como un archivo para cultivos vivos y materiales genéticos (www.atcc.org).

G. Sistemas de expresión

Existen numerosos sistemas de expresión que comprenden al menos una parte o la totalidad de las composiciones tratadas anteriormente. Los sistemas basados en procariotas y/o eucariotas pueden emplearse para su uso con la presente invención para producir secuencias de ácido nucleico, o sus polipéptidos, proteínas y péptidos afines. Muchos sistemas de este tipo se encuentran amplia y comercialmente disponibles.

El sistema de células/baculovirus de insectos puede producir un elevado nivel de expresión de proteínas de un segmento de ácido nucleico heterólogo, tal como se describe en las patentes estadounidenses 5,871,986, 4,879,236, y que pueden adquirirse, por ejemplo, con el nombre MAXBAC® 2.0 de INVITROGEN® y BACPACK™ BACULOVIRUS EXPRESSION SYSTEM FROM CLONTECH®.

Además de los sistemas de expresión revelados de la invención, otros ejemplos de sistemas de expresión incluyen el sistema de expresión de mamíferos inducible STRATAGENE®'s COMPLETE CONTROL™, que implica un receptor inducible por ecdisoma, o su sistema de expresión de pET, un sistema de expresión de E. coli. Otro ejemplo de un sistema de expresión inducible se encuentra disponible de INVITROGEN®, el cual lleva el sistema T-REX™ (expresión regulada por tetraciclina), un sistema de expresión de mamíferos inducible que utiliza el promotor CMV de longitud completa. INVITROGEN® también proporciona un sistema de expresión en levaduras denominado sistema de expresión en *Pichia methanolica*, que está diseñado para una producción de alto nivel de proteínas recombinantes en la levadura metilotrófica *Pichia methanolica*. Un experto en el arte sabría cómo expresar un vector, tal como un constructo de expresión, para producir una secuencia de ácido nucleico o su polipéptido, proteína o péptido afín.

V. Polisacáridos

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden además comprender polisacáridos capsulares que incluyen uno o más del polisacárido capsular PIA (también conocido como PNAG) y/o el *S. aureus* de Tipo V y/o tipo VIII y/o el polisacárido capsular *S. epidermidis* de Tipo I, y/o Tipo II y/o Tipo III.

H. PIA (PNAG)

Está claro actualmente que las diversas formas de polisacáridos de superficie estafilocócicos identificados como PS/A, PIA y SAA son la misma entidad química - PNAG (Maira-Litran *et al.*, 2004). Por lo tanto, el término PIA o PNAG abarca todos los polisacáridos u oligosacáridos obtenidos de los mismos.

PIA es una adhesina polisacárida intercelular y está compuesta de un polímero de glucosamina unida por enlace β -(1→6) sustituida con constituyentes N-acetilo y O-succinilo. Este polisacárido está presente tanto en el *S. aureus* como en el *S. epidermidis* y puede ser aislado de cualquier fuente (Joyce *et al.*, 2003; Maira-Litran *et al.*, 2002). Por ejemplo, el PNGA puede aislarse de la cepa MN8m (WO04/43407) del *S. aureus*. La PIA aislada de *S. epidermidis* es un constituyente integral de la biopelícula. Es responsable de mediar en la adhesión célula-célula y probablemente también funciona para proteger la colonia en crecimiento de la respuesta inmune del huésped. Recientemente, se mostró que el polisacárido conocido previamente como N-succinil- β -(1→6)-glucosamina (PNSG) no tiene la estructura esperada ya que la identificación de la N-succinilación era incorrecta (Maira-Litran *et al.*, 2002). Por lo tanto, el polisacárido conocido formalmente como PNSG y que se ha encontrado ahora que es PNAG, también se encuentra abarcado por el término PIA.

PIA (o PNAG) pueden ser de diferentes tamaños que varían desde aproximadamente 400kDa hasta entre 75 y 400kDa hasta entre 10 y 75kDa, hasta oligosacáridos compuestos de hasta 30 unidades de repetición (de glucosamina unida por un enlace β -(1→6) sustituida con constituyentes N-acetilo y O-succinilo. Cualquier tamaño del polisacárido u oligosacárido de PIA puede ser utilizado en una composición inmunogénica de la invención, en un aspecto el polisacárido es de aproximadamente 40kDa. El dimensionamiento puede lograrse mediante cualquier método conocido en el arte, por ejemplo mediante microfluidización, irradiación ultrasónica o mediante escisión química (WO 03/53462, EP497524, EP497525). En determinados aspectos PIA (PNGA) es al menos o como máximo de 40-400kDa, 40-300kDa, 50-350kDa, 60-300kDa, 50-250kDa y 60-200kDa.

PIA (PNAG) puede tener un diferente grado de acetilación debido a la sustitución por acetato en los grupos amino. PIA producida *in vitro* es casi totalmente sustituida en los grupos amino (95- 100%). De forma alternativa, puede

utilizarse una PIA (PNAG) desacetilada con menos del 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% de acetilación. Se prefiere el uso de una PIA (PNGA) desacetilada ya que los epítomos no acetilados de la PNAG son eficaces en la mediación de la muerte opsónica de bacterias Gram-positivas, preferiblemente *S. aureus* y/o *S. epidermidis*. En determinados aspectos, PIA (PNAG) tiene un tamaño de entre 40kDa y 300kDa y está desacetilado de manera que un 60%, 50%, 40%, 30% o 20% de los grupos de aminoácidos esta están acetilados.

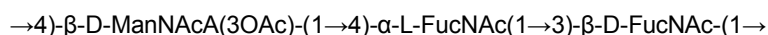
El término PNAG (dPNAG) desacetilado hace referencia a un polisacárido u ologosacárido PNGA en el que menos de un 60%, 50%, 40%, 30%, 20% o 10% de los grupos amino están acetilados. En ciertos aspectos, PNGA es desacetilado para formar dPNGA tratando químicamente el polisacárido nativo. Por ejemplo, el PNGA nativo es tratado con una solución básica de tal forma que el pH se eleva hasta aproximadamente 10. Por ejemplo, el PNGA se trata con 0,1-5 M, 0,2-4 M, 0,3-3 M, 0,5-2 M, 0,75-1,5 M o 1 M NaOH, KOH o NH₄OH. El tratamiento es durante al menos 10 a 30 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 o 20 horas a una temperatura de 20-100, 25-80, 30-60 o 30-50 o 35-45 °C. Se puede preparar dPNGA tal como se describe en la WO 04/43405.

El polisacárido o polisacáridos pueden conjugarse o no conjugarse a una proteína transportadora.

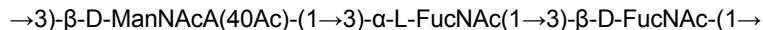
I. Polisacáridos del Tipo 5 y Tipo 8 del *S. aureus*

La mayoría de las cepas de *S. aureus* que causan infección pueden contener polisacáridos del Tipo 5 o del Tipo 8. Aproximadamente un 60% de las cepas humanas son del Tipo 8 y aproximadamente un 30% son del Tipo 5. Las estructuras de los antígenos del polisacárido capsular del Tipo 5 y Tipo 8 se describen en Moreau *et al.*, (1990) y en Fournier *et al.*, (1984). Ambos tienen un FucNAcp en su unidad de repetición además de ManNAcA que puede ser utilizado para introducir un grupo sulfhidrilo. Las estructuras son:

Tipo 5



Tipo 8

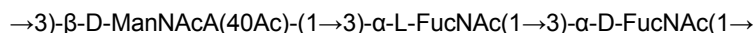


Recientemente (Jones, 2005) la espectroscopia de RMN revisó las estructuras a:

Tipo 5



Tipo 8



Los polisacáridos pueden extraerse de la cepa adecuada de *S. aureus* utilizando un método bien conocido para los expertos en el arte, Ver la Patente estadounidense 6,294,177. Por ejemplo, ATCC 12902 es una cepa de *S. aureus* de Tipo 5 y ATCC 12605 es una cepa de *S. aureus* de Tipo 8.

Los polisacáridos son de tamaño nativo o pueden dimensionarse de forma alternativa, por ejemplo mediante microfluidización, irradiación ultrasónica, o mediante tratamiento químico. La invención además incluye oligosacáridos derivados de los polisacáridos del Tipo 5 y 8 del *S. aureus*. Los polisacáridos del tipo 5 y 8 incluidos en la composición inmunogénica de la invención, se conjugan preferiblemente con una proteína transportadora tal como se describe más adelante, o alternativamente no se conjugan. Las composiciones inmunogénicas de la invención contienen de forma alternativa un polisacárido del tipo 5 o bien del tipo 8.

J. Antígeno 336 del *S. aureus*

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende el antígeno 336 del *S. aureus* descrito en la patente estadounidense 6,294,177. El antígeno 336 comprende una hexosamina con enlace β , no contiene ningún grupo O-acetilo, y específicamente se une a los anticuerpos del *S. aureus* de tipo 336 depositados bajo la referencia ATCC 55804. En una realización, el antígeno 336 es un polisacárido que es del tamaño nativo o que puede ser dimensionado de manera alternativa, por ejemplo, mediante microfluidización, y radiación ultrasónica, o por tratamiento químico. La invención también incluye oligosacáridos obtenidos a partir del antígeno 336. El antígeno 336 puede estar no conjugado o conjugado a una proteína transportadora.

K. Polisacáridos de tipo I, II y III del *S. epidermidis*

Entre los problemas asociados con el uso de los polisacáridos en la vacunación se encuentra el hecho de que los polisacáridos per se son inmunógenos débiles. Se prefiere que los polisacáridos utilizados en la invención se enlacen a una proteína transportadora que proporcione la colaboración de un linfocito T "bystander" (activación inespecífica) para mejorar la inmunogenicidad. Ejemplos de tales transportadoras que pueden conjugarse a inmunógenos polisacáridos incluyen los toxoides de la Difteria y el Tétanos (DT, DT CRM197 y TT, respectivamente), hemocianina extraída de lapa californiana (KLH, por sus siglas en inglés), y el derivado proteico purificado (PPD) de la Tuberculina, exoproteína A de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA), proteína D de la *Haemophilus influenzae*, pneumolisina o fragmentos de cualquiera de las anteriores. Entre los fragmentos adecuados para su uso se incluyen fragmentos que abarcan epítomos T-auxiliares. En particular, el fragmento de la proteína D de la H. influenza contiene preferiblemente el 1/3 en el extremo N-terminal de la proteína. La proteína D es una proteína de unión a IgD de la *Haemophilus influenzae* (EP 0 594 610 B1) y es un potencial inmunógeno. Además, las proteínas estafilocócicas pueden ser utilizadas como proteína transportadora en los conjugados de polisacáridos de la invención.

Una proteína transportadora que sería particularmente ventajosa para su uso en el contexto de vacunas estafilocócicas es el toxoide alfa estafilocócico. La forma nativa puede conjugarse a un polisacárido ya que el proceso de conjugación reduce la toxicidad. Preferiblemente, las toxinas alfa detoxificadas tales como las variantes His35Leu o His35Arg se utilizan como transportadoras ya que la toxicidad residual es menor. De manera alternativa, la toxina alfa se detoxifica químicamente mediante tratamiento con un reactivo de entrecruzamiento, formaldehído o glutaraldehído. Una toxina alfa genéticamente detoxificada es detoxificada químicamente de forma opcional, preferiblemente mediante tratamiento con un reactivo de entrecruzamiento, formaldehído o glutaraldehído para reducir adicionalmente la toxicidad.

Los polisacáridos pueden enlazarse a la proteína o proteínas transportadoras mediante cualquier método conocido (por ejemplo, los métodos descritos en las patentes estadounidenses 4,372,945, 4,474,757, y 4,356,170). Preferiblemente, se lleva a cabo la química de conjugación con CDAP (ver WO95/08348). En CDAP, el reactivo de cianilación tetrafluoroborato de 1-ciano-dimetilaminopiridinio (CDAP) se utiliza preferiblemente para la síntesis de conjugados de polisacárido-proteína. La reacción de cianilación puede realizarse según condiciones relativamente suaves, que evitan la hidrólisis de los polisacáridos sensibles a la alcalinidad. Esta síntesis permite un acoplamiento directo con una proteína transportadora.

La conjugación implica preferiblemente producir un enlace directo entre la proteína transportadora y el polisacárido. Opcionalmente, se puede introducir un espaciador (tal como dihidruro adipico (ADH)) entre la proteína transportadora y el polisacárido.

IV. Respuesta inmune y Ensayos

Tal como se ha tratado anteriormente, la invención hace referencia a provocar o inducir una respuesta inmune en un sujeto contra una Variante de SpA o péptido de coagulasa. En una realización, la respuesta inmune puede proteger contra a un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene, o está en riesgo de desarrollar una infección o enfermedad relacionada con la misma, en particular las asociadas a estafilococos. Un uso de las composiciones inmunogénicas de la invención es prevenir las infecciones nosocomiales mediante la inoculación a un sujeto antes de someterse a un tratamiento en un hospital o en otro entorno con un elevado riesgo de infección.

A. Inmunoensayos

La presente revelación incluye la implementación de ensayos serológicos para evaluar si y hasta qué punto una respuesta inmune es inducida o provocada por las composiciones de la invención. Existen muchos tipos de inmunoensayos que pueden ser implementados. Los inmunoensayos que abarca la presente revelación incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la patente estadounidense 4,367,110 (ensayo tipo sándwich de doble anticuerpo monoclonal) y en la patente estadounidense 4,452,901 (ensayo western blot). Otros ensayos incluyen la inmunoprecipitación de ligandos marcados e inmunocitoquímica, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los inmunoensayos generalmente son ensayos de unión. Determinados inmunoensayos preferidos son los diversos tipos de ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y radioinmunoensayos (RIA) conocidos en el arte. La detección inmunohistoquímica utilizando secciones de tejidos es también particularmente útil. En un ejemplo, se inmovilizan anticuerpos o antígenos en una superficie seleccionada, tal como un pocillo en una placa de microtitulación de poliestireno, varilla graduada, o soporte en columna. A continuación, una composición de prueba que se sospecha contiene al antígeno o anticuerpo deseado, tal como una muestra clínica, se añade a los pocillos. Después de la unión y del lavado para eliminar complejos inmunes enlazados de manera no específica, puede detectarse el antígeno o el anticuerpo. La detección se logra generalmente mediante la adición de otro anticuerpo, específico para el antígeno o anticuerpo deseado, que está unido a un marcador detectable. Este tipo de ELISA se

conoce como "ELISA tipo sándwich". La detección puede también lograrse mediante la adición de un segundo anticuerpo específico para el antígeno deseado, seguido de la adición de un tercer anticuerpo que tiene afinidad de unión para el segundo anticuerpo, estando el tercer anticuerpo unido a un marcador detectable.

Los ensayos ELISA de competición son también posibles implementaciones en las que las muestras de ensayo compiten para unirse con cantidades conocidas de antígenos o anticuerpos marcados. La cantidad de especies reactivas en la muestra desconocida se determina mezclando la muestra con las especies marcadas conocidas antes o durante la incubación con pocillos revestidos. La presencia de especies reactivas en la muestra actúa para reducir la cantidad de especies marcadas disponibles para unirse al pocillo y por tanto reduce la señal final. Independientemente del formato empleado, los ensayos ELISA tienen determinadas características en común, tales como recubrimiento, incubación o unión, lavado para eliminar las especies enlazadas de forma no específica, y detección de los complejos inmunes enlazados.

Los antígenos o anticuerpos pueden además enlazarse a un soporte sólido, como por ejemplo a una en forma de placa, perlas, varilla graduada, membrana o matriz en columna, y la muestra a ser analizada se aplica al antígeno o anticuerpo inmovilizado. A la hora de recubrir una placa bien con un antígeno o bien con un anticuerpo, generalmente se incubarán los pocillos de la placa con una solución del antígeno o el anticuerpo, bien durante la noche o durante un periodo de tiempo específico. Los pocillos de la placa se lavarán entonces para eliminar el material adsorbido de forma incompleta. Cualquier superficie disponible restante de los pocillos se "recubren" a continuación con una proteína no específica que es antigénicamente neutral con respecto al antisuero del ensayo. Estas incluyen albúmina de suero bovino (BSA), caseína, y soluciones de leche en polvo. El recubrimiento permite el bloqueo de sitios de adsorción no específicos en la superficie de inmovilización y por tanto reduce el fondo causado por la unión no específica del antisuero sobre la superficie.

El término "anticuerpos" tal como se utiliza en la presente patente incluye anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, de cadena única, biespecíficos, simianizados, y humanizados o primatizados además de fragmentos Fab, tales como aquellos fragmentos que mantienen la especificidad de la unión de los anticuerpos, incluyendo los productos de una genoteca de expresión de inmunoglobulina Fab. Por consiguiente, la invención contempla el uso de cadenas únicas tales como la cadena pesada y ligera variable de los anticuerpos. La generación de cualquiera de estos tipos de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo es bien conocida por los expertos en el arte. Pueden encontrarse ejemplos específicos de la generación de un anticuerpo para una proteína bacteriana en la Solicitud de patente estadounidense con número de publicación N° 20030153022.

Cualquiera de los polipéptidos, proteínas, péptidos, y/o anticuerpos descritos anteriormente pueden ser marcados directamente con un marcador detectable para la identificación y cuantificación de bacterias estafilocócicas. Los marcadores para su uso en inmunoensayos son conocidos en general para los expertos en el arte e incluye enzimas, radioisótopos, y sustancias fluorescentes, luminiscentes y cromogénicas, incluyendo particular tales como oro coloidal o perlas de látex. Los inmunoensayos adecuados incluyen ensayos de inmuoadsorción enzimática (ELISA).

C. Inmunidad protectora

En algunos modos de realización de la invención, las composiciones proteicas confieren inmunidad protectora a un sujeto. La inmunidad protectora hace referencia a la habilidad del cuerpo de elaborar una respuesta inmune que proteja al sujeto de desarrollar una enfermedad o condición en particular que implica el agente contra el cual hay una respuesta inmune. Una cantidad inmunogénicamente efectivo es capaz de conferir inmunidad protectora al sujeto.

Tal como se utiliza en la presente patente en la especificación y en la sección de las reivindicaciones que sigue a continuación, los términos polipéptido o péptido hacen referencia a un tramo de aminoácidos enlazados de forma covalente entre los mismos mediante enlaces peptídicos. Los diferentes polipéptidos tienen diferentes funcionalidades de acuerdo con la presente invención. Mientras que según un aspecto un polipéptido se obtiene de un inmunógeno diseñado para inducir una respuesta inmune activa en un receptor, según otro aspecto de la invención, un polipéptido se obtiene a partir de un anticuerpo que se obtiene como resultado a continuación de la provocación de una respuesta inmune activa en, por ejemplo, un animal, y que puede utilizarse para inducir una respuesta inmune pasiva en un receptor. En ambos casos, sin embargo, el polipéptido es codificado por un polinucleótido de acuerdo con cualquier uso posible del codón.

Tal como se utiliza en la presente patente la frase "respuesta inmune" o su equivalente "respuesta inmunológica" hace referencia al desarrollo de una respuesta humoral (mediada por anticuerpos), celular (mediada por linfocitos T específicos del antígeno o sus productos de secreción), o ambas humoral y celular dirigida contra una proteína, péptido, carbohidrato, o polipéptido de la invención en un paciente receptor. Una respuesta de este tipo puede ser una respuesta activa inducida por la administración de un inmunógeno o una respuesta pasiva inducida por la administración de un anticuerpo, material que comprende anticuerpos, o linfocitos T activados (primed). Una respuesta inmune celular es provocada por la presentación de epítopos polipeptídicos en asociación con moléculas de MHC de Clase I o de Clase II, para activar los linfocitos T auxiliares CD4 (+) específicos al antígeno y/o linfocitos

T citotóxicos CD8 (+). La respuesta puede además implicar la activación de monocitos, macrófagos, células NK, basófilos, células dendríticas, astrocitos, células microgliales, eosinófilos u otros componentes de inmunidad innata. Tal como se utiliza en la presente patente "inmunidad activa" hace referencia a cualquier inmunidad conferida a un sujeto mediante la administración de un antígeno.

5 Tal como se utiliza en la presente patente "inmunidad pasiva" hace referencia a cualquier inmunidad conferida a un sujeto sin la administración de un antígeno al sujeto. "Inmunidad pasiva" por tanto incluye, pero no se limita a, la administración de efectores activados inmunes que incluyen mediadores celulares o mediadores proteicos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y/o policlonales) de una respuesta inmune. Una composición monoclonal o policlonal puede ser utilizada en la inmunización pasiva para la prevención o tratamiento de la infección por organismos que portan el antígeno reconocido por el anticuerpo. Una composición de anticuerpos puede incluir anticuerpos que se unen a una variedad de antígenos que pueden a su vez estar asociados con diversos organismos. El componente anticuerpo puede ser un antisuero policlonal. En ciertos aspectos el anticuerpo o anticuerpos se purifican por afinidad a partir de un animal o un segundo sujeto al que se ha sometido a una prueba de provocación con un antígeno o antígenos. De manera alternativa, puede utilizarse una mezcla de anticuerpos, que es una mezcla de anticuerpos monoclonales o policlonales para antígenos presentes en los mismos, relacionados o diferentes microbios u organismos, tales como bacterias gram-positivas, bacterias gram-negativas, incluyendo pero sin limitarse a bacterias estafilococos.

Se puede impartir inmunidad pasiva a un paciente o sujeto administrando al paciente inmunoglobulinas (Ig) y/u otros factores inmunes obtenidos de un donante, o de otra fuente que no sea un paciente que presente inmunorreactividad conocida. En otros aspectos, una composición antigénica de la presente invención puede ser administrada a un sujeto que entonces actúa como una fuente o donante de globulina, producida en respuesta a la prueba de provocación con la composición antigénica ("globulina hiperinmune"), que contiene anticuerpos dirigidos contra *Staphylococcus* u otro organismo. Un sujeto tratado de este modo donaría plasma a partir de la cual se obtendría la globulina hiperinmune, mediante metodología de fraccionamiento en plasma convencional, y se administraría a otro sujeto para conferir resistencia contra una infección por estafilococos o tratar la misma. Las globulinas hiperinmunes de acuerdo con la invención son particularmente útiles para individuos inmunocomprometidos, para individuos sometidos a procedimientos invasivos o en los casos en los que el tiempo no permite al individuo producir sus propios anticuerpos en respuesta a la vacunación. Ver las patentes estadounidenses 6,936,258, 6,770,278, 6,756,361, 5,548,066, 5,512,282, 4,338,298, and 4,748,018 para ejemplos de métodos y composiciones relacionadas con la inmunidad pasiva.

Para los propósitos de esta especificación y las reivindicaciones anexas los términos "epítipo" y "determinante antigénico" se utilizan indistintamente para referirse a un sitio en un antígeno al que responden o reconocen los linfocitos B y/o T. Los epítipos de linfocitos B pueden estar formados a partir de tanto aminoácidos contiguos como aminoácidos no continuos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos son habitualmente conservados en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados por el plegamiento terciario se pierden habitualmente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye habitualmente al menos 3, y más usualmente al menos 5 u 8-10 aminoácidos en una única conformación espacial. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía por rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Ver, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols (1996). Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden ser identificados en un inmunoensayo simple que muestra la habilidad de un anticuerpo de bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana. Los linfocitos T reconocen epítipos continuos de aproximadamente nueve aminoácidos para células CD8 o aproximadamente 13;15 aminoácidos para células CD4. Los linfocitos T que reconocen el epítipo pueden ser identificados mediante ensayos *in vitro* que miden la proliferación dependiente del antígeno, según se determina mediante la incorporación de ³H-timidina por parte de linfocitos T activados en respuesta a un epítipo (Burke *et al.*, 1994), por muerte celular dependiente del antígeno (ensayo de linfocitos T citotóxicos, Tigges *et al.*, 1996) o por secreción de citoquinas.

La presencia de una respuesta inmunológica mediada por la célula puede ser determinada por ensayos de proliferación (Linfocitos T CD4 (+)) o ensayos CTL (Linfocitos T citotóxicos). Las contribuciones relativas de las respuestas celulares y humorales al efecto protector o terapéutico de un inmunógeno pueden distinguirse aislando por separado la IgG y los linfocitos T de un animal singénico inmunizado y midiendo el efecto protector o terapéutico en un segundo sujeto.

Tal como se utiliza en la presente patente y en las reivindicaciones, los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se utilizan de manera intercambiable y hacen referencia a cualquiera de diversas clases de proteínas relacionadas estructuralmente que funcionan como parte de la respuesta inmune de un animal o receptor, proteínas que incluyen IgG, IgD, IgE, IgA, IgM y proteínas asociadas.

En condiciones fisiológicas normales, se observan anticuerpos en plasma y en otros fluidos corporales y en la membrana de ciertas células y se producen mediante linfocitos del tipo denominado linfocitos B o su equivalente funcional. Los anticuerpos de la clase IgG están compuestos por cadenas de polipéptidos unidas entre sí mediante

enlaces disulfuro. Las cuatro cadenas de moléculas de IgG intactas son dos cadenas pesadas idénticas denominadas las cadenas H, y dos cadenas ligeras denominadas cadenas L.

Para producir anticuerpos policlonales, un huésped, tal como un conejo o una cabra, se inmuniza con el antígeno o fragmento de antígeno, generalmente con un adyuvante y, si fuera necesario, se acopla a un transportador. Los anticuerpos para el antígeno se recogen posteriormente del suero del huésped. El anticuerpo policlonal puede ser purificado por afinidad contra el antígeno, volviéndolo mono-específico.

Pueden producirse anticuerpos monoclonales mediante hiperinmunización de un donante apropiado con el antígeno, o *ex vivo* mediante el uso de cultivos primarios de células esplénicas o líneas celulares obtenidas del bazo (Anavi, 1998; Huston *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1991; Mernaugh *et al.*, 1995).

Tal como se utiliza en la presente patente y en las reivindicaciones, la frase “parte inmunológica de un anticuerpo” incluye un fragmento Fab de un anticuerpo, un fragmento Fv de un anticuerpo, una cadena pesada de un anticuerpo, un heterodímero que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera de un anticuerpo, un fragmento variable de una cadena ligera de un anticuerpo, un fragmento variable de una cadena pesada de un anticuerpo, y una variante de cadena única de un anticuerpo, que también se conoce como scFv. Además, el término incluye inmunoglobulinas quiméricas que son los productos de expresión de genes fusionados obtenidos a partir de diferentes especies, una de las especies puede ser un humano, en cuyo caso se dice que la inmunoglobulina quimérica está humanizada. Habitualmente, una parte inmunológica de un anticuerpo compite con el anticuerpo intacto a partir del cual fue obtenida para su unión específica a un antígeno.

Opcionalmente, un anticuerpo o preferiblemente una parte inmunológica de un anticuerpo, puede conjugarse químicamente a, o expresarse como, una proteína de fusión con otras proteínas. Para los propósitos de esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, todas las proteínas fusionadas de este tipo se incluyen en la definición de anticuerpos o de una parte inmunológica de un anticuerpo.

Tal como se utilizan en la presente patente, los términos “agente inmunogénico” o “inmunógeno” o “antígeno” se utilizan de forma intercambiable para describir una molécula capaz de inducir una respuesta inmunológica contra sí misma ante la administración a un receptor, ya sea solo, en conjunción con un adyuvante o en un vehículo de presentación.

D. Métodos de tratamiento

Puede proporcionarse un polipéptido inmunogénico de la invención para inducir una respuesta inmune en una persona infectada con estafilococos o que se sospecha ha estado expuesta a estafilococos. Pueden emplearse métodos con respecto a individuos que han dado positivo en un test de exposición a estafilococos, o que se considera están en riesgo de infección en base a una posible exposición.

En particular, la invención abarca composiciones para su uso en un método de tratamiento para infecciones estafilocócicas, en particular infecciones nosocomiales intrahospitalarias. Las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la invención son particularmente ventajosas para su uso en casos de cirugía electiva. Tales pacientes conocerán la fecha de su cirugía por adelantado y podrían ser inoculados con antelación. Las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la invención resultan también ventajosas para su uso para inocular a trabajadores sanitarios.

En algunos modos de realización, el tratamiento se administra en presencia de adyuvantes o transportadores u otros antígenos estafilocócicos. Además, en algunos ejemplos, el tratamiento comprende la administración de otros agentes utilizados normalmente contra una infección bacteriana, como por ejemplo uno o más antibióticos.

El uso de péptidos para la vacunación puede requerir, pero no necesariamente, la conjugación del péptido con una proteína transportadora inmunogénica, tal como el antígeno de superficie, hemocianina extraída de la lapa californiana, o la albúmina de suero bovino. Los métodos para llevar esta conjugación se conocen bien en el arte.

Vacunas VL y otras composiciones farmacéuticas y administración

E. Vacunas

La presente invención incluye métodos para prevenir o mejorar infecciones estafilocócicas, en particular infecciones nosocomiales intrahospitalarias. Como tal, la invención contempla vacunas para su uso en realizaciones de inmunización tanto pasiva como activa. Las composiciones inmunogénicas, que se proponen como adecuadas para su uso como vacunas, pueden prepararse a partir de un polipéptido o polipéptidos de SpA inmunogénicos, tal como una variante del dominio D de la SpA, o coagulasas inmunogénicas. En otros modos de realización pueden utilizarse coagulasas o SpA en combinación con otras proteínas de virulencia secretadas, proteínas de superficie o

fragmentos inmunogénicos de las mismas. En ciertos aspectos, el material antigénico es ampliamente dializado para eliminar moléculas de reducido peso molecular no deseadas y/o se liofilizan para una formulación más sencilla en un vehículo deseado.

Otras opciones para una vacuna basa en una proteína/péptido implican la introducción de ácidos nucleicos que codifican el antígeno o los antígenos como vacunas de ADN. A este respecto, informes recientes describen la construcción de virus vaccinia recombinantes que expresan o bien 10 epítomos CTL mínimos (Thomson, 1996) o una combinación de linfocitos B, linfocitos T citotóxicos (CTL), y epítomos de linfocitos T auxiliares (Th) de diversos microbios (An, 1997), y el uso exitoso de tales constructos para inmunizar ratones para respuestas inmunes protectoras de cebado. Por tanto, existe amplia evidencia en la literatura para la utilización con éxito de péptidos, células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés) pulsadas con péptidos, y constructos de codificación de péptidos para un cebado *in vivo* eficaz de respuestas inmune protectoras. El uso de secuencias de ácido nucleico como vacunas se ejemplifica en las Patentes estadounidenses 5,958,895 y 5,620,896.

La preparación de vacunas que contienen secuencias de polipéptidos o péptidos como ingredientes activos se comprende bien en general en el arte, tal como se ejemplifica por las patentes estadounidenses 4,608,251; 4,601,903; 4,599,231; 4,599,230; 4,596,792; y 4,578,770. Habitualmente, tales vacunas se preparan como inyectables ya sea como soluciones líquidas o suspensiones: también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en o suspensión en un líquido antes de la inyección. La preparación puede además ser emulsionada. El ingrediente inmunogénico activo se mezcla a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, suero fisiológico, dextreosa, glicerol, etanol, o similar y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la vacuna puede contener cantidades de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tampón de pH, o adyuvantes que aumentan la efectividad de las vacunas. En modos de realización específicos, las vacunas se formulan con una combinación de sustancias, según se describe en las patentes estadounidenses 6,793,923 y 6,733,7545.

Las vacunas pueden administrarse convencionalmente por vía parenteral, mediante inyección, por ejemplo, ya sea subcutánea o intramuscularmente. Entre las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración se incluyen los supositorios y, en algunos casos, las formulaciones orales. Para los supositorios, entre los aglutinantes y soportes tradicionales se incluyen, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos: tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el rango de aproximadamente un 0,5% hasta aproximadamente un 10%, preferiblemente aproximadamente un 1% hasta aproximadamente un 2%. Las formulaciones orales incluyen tales excipientes utilizados habitualmente como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Estas composiciones toman la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación controlada o polvos y contienen aproximadamente de un 10% hasta aproximadamente un 95% de ingrediente activo, preferiblemente aproximadamente de un 25% a aproximadamente un 70%.

Los constructos de polipéptidos y de ADN que codifica polipéptidos pueden formularse en forma de vacunas en formas neutras o de sales. Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen las sales de adición de ácido tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o tales ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares.

Habitualmente, las vacunas se administran de una forma compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad tal que sea terapéuticamente efectiva e inmunogénica. La cantidad a ser administrada depende del sujeto a ser tratado, incluyendo la capacidad del sistema del individuo para sintetizar anticuerpos y del grado de protección deseado. Las cantidades precisas del ingrediente activo requerido a ser administrado dependen del juicio del profesional médico. Sin embargo, los rangos de dosificación adecuados son del orden de varios cientos de microgramos de ingrediente activo por vacuna. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo son también variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de posteriores inoculaciones u otras administraciones.

La manera de aplicación puede variar ampliamente. Se puede aplicar cualquiera de los métodos convencionales para la administración de una vacuna. Se cree que entre estos se puede incluir la aplicación por vía oral en una base sólida fisiológicamente aceptable o en una dispersión fisiológicamente aceptable, por vía parenteral, mediante inyección o similar. La dosificación de la vacuna dependerá de la vía de administración y variará de acuerdo al tamaño y la salud del sujeto.

En ciertos casos, será deseable realizar múltiples administraciones de la vacuna, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más administraciones. Las vacunas pueden ser en intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 semanas, incluyendo todos los rangos entre las mismas. Será deseable realizar refuerzos periódicos en intervalos de 1-5 años para mantener los niveles protectores de los anticuerpos. Se puede realizar un seguimiento del transcurso de la

inmunización mediante ensayos para anticuerpos contra los antígenos, tal como se describe en las patentes estadounidenses 3,791,932; 4,174,384 y 3,949,064.

1. Transportadores

Una composición determinada puede variar en su inmunogenicidad. Por lo tanto, es necesario a menudo reforzar el sistema inmune del huésped, tal como puede lograrse acoplando un péptido o polipéptido a un transportador. Soportes preferidos y ejemplos de los mismos son la hemocianina de lapa californiana (KLH) y la albúmina de suero bovino (BSA). Otras albúminas tales como la ovoalbúmina, albúmina sérica de ratón, o albúmina sérica de conejo pueden también utilizarse como transportadores. Se conocen bien en el arte medios para conjugar un polipéptido a una proteína transportadora e incluyen glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida, y bencidina bis-biazotizada.

2. Adyuvantes

La inmunogenicidad de las composiciones de péptidos o polipéptidos puede aumentarse mediante el uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmune, conocidos como adyuvantes. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen todos los compuestos inmunoestimuladores aceptables, tales como las citoquinas, toxinas, o composiciones sintéticas. Puede utilizarse una cantidad de adyuvantes para aumentar la respuesta de un anticuerpo contra un polipéptido de SpA o coagulasa variante, o cualquier otra proteína bacteriana o combinación contemplada en la presente patente. Los adyuvantes pueden (1) atrapar el antígeno en el organismo para causar una liberación lenta; (2) atraer a las células implicadas en la respuesta inmune al sitio de administración; (3) inducir la proliferación o activación de las células del sistema inmune; o (4) mejorar la propagación del antígeno a través del organismo del sujeto.

Entre los adyuvantes se incluyen, pero sin limitarse a, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, sales minerales, polinucleótidos, y sustancias naturales. Los adyuvantes específicos que pueden utilizarse incluyen IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, interferón- γ , GMCSP, BCG, sales de aluminio, tales como hidróxido de aluminio u otros compuestos de aluminio, compuestos MDP, tales como α -keto-MDP y β -keto-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A, y monofosforil lípido A (MPL). El sistema coadyuvante RIBI, que contienen tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS) en una emulsión al 2% de escualeno/Tween 80. Pueden incluso utilizarse antígenos de MHC. Otros adyuvantes o métodos se ejemplifican en las patentes estadounidenses 6,814,971, 5,084,269, 6,656,462).

Diversos métodos para lograr un efecto adyuvante para la vacuna incluye el uso de agentes tales como hidróxido de aluminio o fosfato (alum), utilizado comúnmente como una solución aproximadamente al 0,05 a aproximadamente 0,1% en un tampón de fosfatos, la mezcla con polímeros sintéticos de azúcares (Carbopol®) utilizada como una solución de aproximadamente un 0,25%, la agregación de la proteína en la vacuna mediante tratamiento con calor con temperaturas que oscilan entre aproximadamente 70° a aproximadamente 101°C durante un periodo de 30 segundos a 2 minutos, respectivamente. También puede utilizarse para producir un efecto adyuvante, la agregación mediante la reactivación con anticuerpos tratados con pepsina (Fab) a la albúmina; mezcla con células bacterianas (por ejemplo, *C. parvum*), componentes endotoxinas o lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas; emulsión en vehículos oleaginosos fisiológicamente aceptables (por ejemplo, monooleato de manida (Aracel A)); o una emulsión con solución al 20% de un perfluorocarbono (Fluosol-DA®) que se utiliza como sustituto de bloque.

Ejemplos de adyuvantes y con frecuencia adyuvantes preferidos, incluyen el adyuvante completo de Freund (un estimulador no específico de la respuesta inmune que contiene *Mycobacterium tuberculosis* inactivo), adyuvantes de Freund incompleto, e hidróxido de aluminio.

En algunos aspectos, se prefiere que el adyuvante se seleccione para ser un inductor preferente de una respuesta de tipo Th1 o Th2. Los niveles elevados de citoquinas de tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales al antígeno.

La distinción de la respuesta inmune de tipo Th1 o Th2 no es absoluta. En la realidad un individuo soportará una respuesta inmune que se describa como predominantemente Th1 o Th2. Sin embargo, a menudo resulta conveniente considerar las familias de citoquinas en términos de las descritas en clones de linfocitos T CD4+ por Mosmann y Coffman (Mosmann, y Coffman, 1989). Tradicionalmente, las respuestas de tipo Th1 están asociadas con la producción de citoquinas del INF- γ y IL-2 por parte de los linfocitos T. Otras citoquinas, asociadas con frecuencia con la inducción de respuestas inmunes de tipo Th1, no son producidas por los linfocitos T, tales como la IL-12. En contraste, las respuestas de tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10.

Además de adyuvantes, puede ser deseable co-administrar modificadores de la respuesta biológica (BRM) para aumentar las respuestas inmunes. Se ha mostrado que los BRM regular por incremento la inmunidad de los linfocitos T o regulan por disminución la actividad de las células supresoras. Tales BRM incluyen, pero no se limitan

a, Cimetidina (CIM; 1200 mg/d) (Smith/Kline, PA); o Ciclofosfamida de dosis baja (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/ Mead, NJ) y citoquinas tales como interferón- γ , IL-2, o IL-12 o genes que codifican proteínas implicadas en funciones auxiliares inmunes, tales como B-7.

F. Componentes lipídicas y motivos

5 En determinados modos de realización, la presente invención hace referencia a composiciones que comprenden uno o más lípidos asociados con un ácido nucleico o un polipéptido/péptido. Un lípido es una sustancia que es insoluble en agua y extraíble con un disolvente orgánico. Los compuestos distintos a los descritos específicamente en la presente patente se entienden como lípidos por parte de un experto en el arte, y son abarcados por las composiciones y métodos de la presente invención. Un componente lipídico y no lipídico pueden unirse entre sí, ya sea de forma covalente como de forma no covalente.

Un lípido puede ser un lípido de origen natural o un lípido sintético. Sin embargo, un lípido es habitualmente una sustancia biológica. Los lípidos biológicos se conocen bien en el arte, e incluyen por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glucoesfinolípidos, glucolípidos, sulfatadas, lípidos con ácidos grasos unidos por éter y éster y lípidos polimerizables, y combinaciones de los mismos.

15 Una molécula de ácido nucleico o un polipéptido/péptido, asociado con un lípido puede dispersarse en una solución que contiene un lípido, disuelta con un lípido, emulsionada con un lípido, mezclada con un lípido, combinada con un lípido, enlazada covalentemente con un lípido, contenida como una suspensión en un lípido o asociada de otro modo a un lípido. Una composición lipídica o poxyvirus asociado a lípido de la presente invención no está limitada a ninguna estructura en particular. Por ejemplo, pueden además sencillamente ser entremezclada en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes ni en tamaño ni en forma. En otro ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, como micelos, o con una estructura "caída". En otro ejemplo no limitativo, se contempla también un complejo de lipofectamina (Gibco BRL)-poxyvirus o Superfect (Qiagen)-poxyvirus.

En ciertas realizaciones, una composición puede comprender aproximadamente un 1 %, aproximadamente un 2%, aproximadamente un 3%, aproximadamente un 4% aproximadamente un 5%, aproximadamente un 6%, aproximadamente un 7%, aproximadamente un 8%, aproximadamente un 9%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 11%, aproximadamente un 12%, aproximadamente un 13%, aproximadamente un 14%, aproximadamente un 15%, aproximadamente un 16%, aproximadamente un 17%, aproximadamente un 18%, aproximadamente un 19%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 21%, aproximadamente un 22%, aproximadamente un 23%, aproximadamente un 24%, aproximadamente un 25%, aproximadamente un 26%, aproximadamente un 27%, aproximadamente un 28%, aproximadamente un 29%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 31%, aproximadamente un 32%, aproximadamente un 33%, aproximadamente un 34%, aproximadamente un 35%, aproximadamente un 36%, aproximadamente un 37%, aproximadamente un 38%, aproximadamente un 39%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 41%, aproximadamente un 42%, aproximadamente un 43%, aproximadamente un 44%, aproximadamente un 45%, aproximadamente un 46%, aproximadamente un 47%, aproximadamente un 48%, aproximadamente un 49%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 51%, aproximadamente un 52%, aproximadamente un 53%, aproximadamente un 54%, aproximadamente un 55%, aproximadamente un 56%, aproximadamente un 57%, aproximadamente un 58%, aproximadamente un 59%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 61%, aproximadamente un 62%, aproximadamente un 63%, aproximadamente un 64%, aproximadamente un 65%, aproximadamente un 66%, aproximadamente un 67%, aproximadamente un 68%, aproximadamente un 69%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 71%, aproximadamente un 72%, aproximadamente un 73%, aproximadamente un 74%, aproximadamente un 75%, aproximadamente un 76%, aproximadamente un 77%, aproximadamente un 78%, aproximadamente un 79%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 81%, aproximadamente un 82%, aproximadamente un 83%, aproximadamente un 84%, aproximadamente un 85%, aproximadamente un 86%, aproximadamente un 87%, aproximadamente un 88%, aproximadamente un 89%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 91%, aproximadamente un 92%, aproximadamente un 93%, aproximadamente un 94%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 96%, aproximadamente un 97%, aproximadamente un 98%, aproximadamente un 99%, o cualquier rango entre los mismos, de un componente lípido, tipo de lípido, o no lípido en particular, tal como un adyuvante, antígeno, péptido, polipéptido, azúcar, ácido nucleico u otros materiales revelados en la presente patente, tal como conocería un experto en el arte. En un ejemplo no limitativo, una composición puede comprender aproximadamente un 10% hasta aproximadamente un 20% de lípidos neutrales, y aproximadamente un 33% a aproximadamente un 34% de una cerebroside, y aproximadamente un 1% de colesterol. En otro ejemplo no limitativo, un liposoma puede comprender aproximadamente un 4% a aproximadamente un 12% de terpenos, en donde aproximadamente un 1% de la micela es específicamente licopeno, dejando en aproximadamente un 3% a aproximadamente un 11% de liposoma comprendiendo otros terpenos; y aproximadamente un 10% a aproximadamente un 35% de fosfatidil colina, y aproximadamente un 1% de un componente no lipídico. Por tanto, se contempla que las composiciones de la presente invención pueden comprender cualquiera de los lípidos, tipos de lípidos u otros componentes en cualquier combinación o rango de porcentaje.

G. Terapia de combinación

Las composiciones y métodos relacionados de la presente invención, en particular la administración de un factor de virulencia secretado o una proteína de superficie, incluyendo un péptido o polipéptido de Variante de SpA, y/o otros péptidos o proteínas bacterianas a un paciente/sujeto, pueden también ser utilizadas en combinación con la administración de terapias tradicionales. Estas incluyen, pero no se limitan a, la administración de antibióticos tales como estreptomicina, ciprofloxacino, doxiciclina, gentamicina, cloranfenicol, trimetoprima, sulfametoxazol, ampicilina, tetraciclina o diversas combinaciones de antibióticos.

En un aspecto, se contempla que una vacuna y/o terapia de polipéptidos se utilice en conjunto con tratamiento antibacteriano. De forma alternativa, la terapia puede preceder o ir después del tratamiento con el otro agente en intervalos que oscilan desde minutos a semanas. En realizaciones en las que los otros agentes y/o proteínas o polinucleótidos se administran por separado, debería asegurarse en general que transcurra un período de tiempo significativo entre el tiempo de cada administración, de tal manera que el agente y la composición antigénica serían capaces aún de ejercer un efecto combinado de forma ventajosa en el sujeto. En tales casos, se contempla que se pueden administrar ambas modalidades dentro de aproximadamente 12-24 h entre sí o dentro de aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser deseable extender el período de tiempo para la administración de forma significativa, donde existe un lapso de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a diversas semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre las administraciones respectivas.

Pueden emplearse diversas combinaciones, por ejemplo la terapia con antibióticos es "A" y la molécula inmunogénica proporcionada como parte de un régimen de terapia inmune, tal como un antígeno, es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/AB A/A/AB B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

La administración de composiciones inmunogénicas de la presente invención a un paciente/sujeto seguirá protocolos generales para la administración de tales compuestos, teniendo en cuenta la toxicidad, si hubiera alguna, de la composición de SpA, u otras composiciones descritas en la presente patente. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. Se contempla también que diversas terapias estándar, tal como la hidratación, pueden ser aplicadas en combinación con la terapia descrita.

H. Composiciones farmacéuticas en general

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran a un sujeto. Diferentes aspectos de la presente invención implican administrar una cantidad efectiva de una composición a un sujeto. En algunos modos de realización de la presente revelación, los antígenos estafilocócicos, miembros de la vía Ess, incluyendo péptidos y polipéptidos de la clase Esa o Esx, y/o miembros de sustratos de sortasa pueden ser administrados al paciente para protegerle contra la infección por uno o más patógenos de estafilococos. De manera alternativa, un vector de expresión que codifica uno o más polipéptidos o péptidos de este tipo, pueden ser proporcionados a un paciente como un tratamiento preventivo. De manera adicional, tales compuestos pueden ser administrados en combinación con un antibiótico o un antibacteriano. Tales composiciones generalmente serán disueltas o dispersadas en un soporte farmacéuticamente aceptable o un medio acuoso.

Además de los compuestos formulados para la administración parenteral, tales como con inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para la administración por vía oral; cápsulas de liberación controlada; y cualquier otra forma utilizada actualmente, incluyendo cremas, lociones, enjuagues bucales, inhaladores y similares.

Los compuestos activos de la presente invención pueden ser formulados para su administración por vía parenteral, por ejemplo, formulados para la inyección por vía intravenosa, intramuscular, sub-cutánea, o incluso intraperitoneal. La preparación de una composición acuosa que contiene un compuesto o compuestos que aumenten la expresión de una molécula MHC de clase I, resultará conocido para los expertos en el arte a la vista de la presente revelación. Habitualmente, tales composiciones pueden prepararse como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su uso para preparar soluciones o suspensiones tras la adición de un líquido previamente a la inyección; y, las preparaciones pueden también emulsionarse.

Pueden prepararse en agua soluciones de los compuestos activos como bases libres o sales farmacológicamente aceptables, mezcladas de forma adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y aceites. Bajo condiciones

normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para su uso como inyectables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuate, o propilenglicol; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta un grado en el que pueda ser inyectada fácilmente. Debe ser estable bajo condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser conservada contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

Las composiciones proteicas pueden formularse en una forma neutra o de sal. Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína), y que están formadas con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico y fosfórico, o aceites orgánicos tales como el ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Pueden también obtenerse sales formadas con los grupos carboxilo libres a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, de potasio, de amonio, de calcio o férrico, y tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

El soporte también puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Puede mantenerse una fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula adecuado en el caso de una dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. Puede lograrse la prevención de la acción de microorganismos mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se preparan soluciones inyectables incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente adecuado con diversos de los demás ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de una esterilización por filtrado. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de entre los que se han enumerado anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de las soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización, lo que produce un polvo del ingrediente activo, más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución del mismo previamente esterilizada por filtrado.

La administración de los componentes de acuerdo a la presente invención será en general a través de cualquier vía habitual. Esto incluye, pero no se limita a la administración oral, nasal o bucal. De manera alternativa, la administración puede ser por inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, o intravenosa. En determinados modos de realización, una composición para vacuna puede ser inhalada (por ejemplo, Patente estadounidense 6,651,655, que se incorpora específicamente a modo de referencia). Tales composiciones se administrarían normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables que incluyen soportes fisiológicamente aceptables, tampones u otros excipientes. Tal como se utiliza en la presente patente, el término "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance de un juicio médico fiable, adecuados para entrar en contacto con tejidos humanos y animales sin una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas en proporción a una relación beneficio/riesgo razonable. El término "soporte farmacéuticamente aceptable", significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una sustancia de relleno líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicado en portar o transportar un agente químico.

Para la administración por vía parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar tamponada de forma adecuada, si fuera necesario, y el diluyente líquido debe volverse isotónico en primer lugar con suficiente suero fisiológico o glucosa. Estas soluciones acuosas en particular son especialmente adecuadas para su administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, e intraperitoneal. En conexión con ello, los medios acuosos estériles que pueden ser empleados resultarán conocidos para los expertos en el arte, a la luz de la presente revelación. Por ejemplo, una dosificación podría ser disuelta en una solución de NaCl isotónica, y o bien añadirse a un fluido de hipodermocclisis o bien inyectarse en el sitio propuesto de la infusión, (ver por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990). Algunas variaciones en la dosificación serán necesarias dependiendo de la condición del sujeto. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individualmente.

Se determina una cantidad efectiva de la composición terapéutica o profiláctica en base al objetivo deseado. El término "dosis unitaria" o "dosificación" hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas para su uso en

un sujeto, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de la composición calculada para producir las respuestas deseadas tratadas anteriormente en asociación con la administración, es decir, la vía y el régimen adecuados. La cantidad a ser administrada, tanto de acuerdo con una cantidad de tratamientos como con una dosis unitaria, depende de la protección deseada.

- 5 Las cantidades precisas de la composición también dependen del juicio del profesional sanitario y son específicas para cada individuo. Los factores que afectan a la dosis incluyen el estado físico y clínico del sujeto, la vía de administración, el objetivo deseado del tratamiento (alivio de los síntomas versus cura), y la potencia, estabilidad, y toxicidad de la composición en particular.

- 10 Tras la formulación, se administrarán las soluciones de forma compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéutica o profilácticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente.

I. Administración *In vitro*, *Ex vivo* o *In vivo*

- 15 Tal como se utiliza en la presente patente, el término administración *in vitro* hace referencia a manipulaciones realizadas en células extraídas de o fuera de un sujeto, incluyendo, pero sin limitarse a células en cultivo. El término administración *ex vivo* hace referencia a células que han sido manipuladas *in vitro*, y que se administran posteriormente a un sujeto. El término administración *in vivo* incluye todas las manipulaciones realizadas dentro de un sujeto.

- 20 En ciertos aspectos de la presente invención, las composiciones pueden ser administradas ya sea *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. En ciertos modos de realización *in vitro*, las líneas celulares de linfocitos B autólogos se incuban con un vector vírico de la presente invención durante 24 a 48 horas, o con una SpA y/o coagulasa variante y/o cualquier otra composición descrita en la presente patente durante dos horas. Las células transducidas pueden entonces ser utilizadas para su análisis *in vitro*, o de manera alternativa para su administración *ex vivo*. Las patentes estadounidenses 4,690,915 y 5,199,942, revelan métodos para la manipulación *ex vivo* de células mononucleares sanguíneas y células de la médula ósea para su uso en aplicaciones terapéuticas.

25 VII. Ejemplos

- Los siguientes ejemplos se proporcionan con el propósito de ilustrar diversos modos de realización de la invención y no pretenden limitar la presente invención en modo alguno. Un experto en el arte apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionadas, además de aquellos objetos, fines y ventajas inherentes en la presente patente. Los presentes ejemplos, junto con los métodos descritos en la presente patente son actualmente representativos de modos de realización preferidos, son ejemplos y han de entenderse como limitaciones del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Variantes de la proteína A no toxigénicas como vacunas subunitarias para prevenir infecciones por *Staphylococcus aureus*

- 35 **Un modelo animal para una infección por *S. aureus*** se infectaron ratones BALB/c mediante inyección intravenosa con 1×10^7 UFC del aislado clínico humano *S. aureus* Newman (Baba *et al.*, 2007). Dentro de un periodo de 6 horas a continuación de la infección, 99,999% de los estafilococos desaparecieron de la corriente sanguínea y se distribuyeron a la vasculatura. La diseminación estafilocócica a los tejidos periféricos tuvo lugar rápidamente, a medida que la carga bacteriana en el riñón y otros tejidos de órganos periféricos alcanzaron un valor 1×10^5 UFC g⁻¹
- 40 dentro de las tres primeras horas. La carga estafilocócica en los tejidos del riñón aumentó en 1,5 log de UFC en veinticuatro horas. Cuarenta y ocho horas después de la infección, los ratones desarrollaron abscesos diseminados en múltiples órganos, detectables mediante microscopía óptica de tejido renal en secciones finas, y coloreado con hematoxilina-eosina. El diámetro inicial de los abscesos fue de 524 μ M ($\pm$ 65 μ M); se marcaron inicialmente las lesiones mediante un flujo de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y no albergaban ninguna organización de estafilococos discernible, la mayoría de los cuales parecían residir dentro de las PMN. En el día 5 de la infección, los abscesos aumentaron en tamaño e incluyeron una población central de estafilococos, rodeados de una capa de material amorfo eosinófilo y una gran masa de PMNs. La histopatología reveló una necrosis masiva de los PMN en proximidad a los nidos estafilocócicos en el centro de las lesiones de abscesos, además de un manto de fagocitos saludables. Se observó además un borde de PMNs necróticos en la periferia de las lesiones de abscesos,
- 50 bordeando material eosinófilo, amorfo que separa el tejido renal saludable de las lesiones. Finalmente, los abscesos alcanzaron un diámetro de ≥ 1.524 μ M en el día 15 o 36. En intervalos de tiempo posteriores, la carga estafilocócica fue aumentada a 10^4 - 10^6 UFC g⁻¹ y el crecimiento de lesiones de abscesos migró hacia la cápsula del órgano. Las lesiones periféricas estaban predisuestas a la ruptura, liberando de este modo material necrótico y

estafilococos en la cavidad peritoneal o el espacio retroperitoneal. Estos eventos dieron como resultado una bacteriemia además de una onda secundaria de abscesos, lo que precipitó finalmente un desenlace letal.

Para enumerar la carga estafilocócica en el tejido renal, se sacrificaron los animales, se extirparon sus riñones y el homogeneizado de tejido se extendió sobre medio de agar para la formación de colonias. En el día 5 de la infección, se observó una media de 1×10^6 de UFC g^{-1} de tejido renal para *S. aureus* Newman. Para cuantificar la formación de abscesos, se inspeccionaron visualmente los riñones, y se otorgó a cada órgano individual una puntuación de uno o cero. La suma final se dividió por el número total de riñones para calcular el porcentaje de abscesos en la superficie (Tabla 3). Además, unos riñones elegidos aleatoriamente se fijaron en formalina, se incluyeron, se prepararon en secciones finas, y se colorearon con hematoxilina-eosina. Para cada riñón, se observaron por microscopía cuatro secciones sagitales en intervalos de 200 μm . Se contaron los números de lesiones para cada sección y se calculó la media para cuantificar el número de abscesos dentro de los riñones. El *S. aureus* Newman causó $4,364 \pm 0,889$ de abscesos por riñón, y se observaron abscesos en la superficie en 14 de 20 riñones (70%) (Tabla 3).

Cuando se examinó mediante microscopio de barrido electrónico, el *S. aureus* Newman se situó en césped estrechamente asociado en el centro de los abscesos. Los estafilococos estaban contenidos por pseudocápsulas amorfas que separaban las bacterias de la masa de leucocitos de los abscesos. No se observaron células inmunes en estos nidos centrales de estafilococos, sin embargo se situaron glóbulos rojos ocasionales entre las bacterias. Las poblaciones bacterianas en el centro del absceso, designadas como comunidades de abscesos estafilocócicas (SAC), se mostraron homogéneas y recubiertas por un material granular denso en electrones. La cinética de la aparición de las lesiones infecciosas y los atributos morfológicos de los abscesos formados por el *S. aureus* Newman fueron similares a lo observado tras la infección del ratón con *S. aureus* USA300 (LAC), el actual clon de *S. aureus* epidémico resistente a meticilina adquirido en la comunidad (CA-SARM) en los Estados Unidos (Diep *et al.*, 2006).

Tabla 3. Requerimientos genéticos para la formación de abscesos por *S. aureus* Newman en ratones

Genotipo	Carga estafilocócica en el tejido renal			Formación de Abscesos en tejido renal		
	^a $\log_{10}$ UFC g^{-1} tejido	^b Significancia (Valor-P)	^c Reducción ($\log_{10}$ UFC g^{-1})	^d Abscesos de la Superficie (%)	^e Número de Abscesos Por riñón	^f Significancia (valor P)
Tipo silvestre	6,141 $\pm$ 0,192	-	-	70	4,364 $\pm$ 0,889	-
Δ strA	4,095 $\pm$ 0,347	6,7 $\times 10^{-6}$	2,046	0	0,000 $\pm$ 0,000	0,0216
Spa	5,137 0,374	0,0144	1,004	13	0,375 $\pm$ 0,374	0,0356

^aMedias de la carga estafilocócica calculada como $\log_{10}$ UFC g^{-1} en tejidos renales homogeneizados 5 días a continuación de la infección en cohortes de quince ratones BALB/c por cepa de prueba de provocación. Se indica el error estándar de la media ($\pm$ SEM).

^bSe calculó la significancia estadística con la prueba t de Student y los valores P registrados; los valores P <0,05 se consideraron significativos.

^cSe calculó la reducción en la carga bacteriana como el valor $\log_{10}$ UFC g^{-1} .

^dSe midió la formación de abscesos en los tejidos del riñón cinco días después de la infección mediante inspección macroscópica (% positivo)

^eHistopatología de riñones de ocho a diez animales en secciones finas y con tinción de hematoxilina-eosina; se registró la cantidad media de abscesos por riñón y se calculó la media nuevamente para la media final ($\pm$ SEM).

^fSe calculó la significancia estadística con la prueba t de Student y los valores P registrados; los valores P <0,05 se consideraron significativos.

Mutantes de la proteína A (spa) del *S. aureus* son avirulentos y no pueden formar abscesos La Sortasa A es una transpeptidasa que inmoviliza diecinueve proteínas de superficie en la envoltura de la cepa Newman del *S. aureus* (Mazmanian *et al.*, 1999; Mazmanian *et al.*, 2000). Trabajos anteriores identificaron la sortasa A como un factor de virulencia en múltiples sistemas de modelos de animales, sin embargo las contribuciones de esta enzima y sus proteínas de superficie ancladas para la formación o persistencia de abscesos no han sido aún reveladas (Jonsson *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2004). En comparación con la cepa parental de origen silvestre (Baba *et al.*, 2007), una variante isogénica (Δ strA) no formó lesiones de abscesos ni en el examen macroscópico ni en la histopatología en los días 2, 5, o 15. En los ratones infectados con el mutante de strA, únicamente se recuperó 1×10^4 UFC g^{-1} del tejido renal en el día 5 de la infección que es una reducción de 2,046 $\log_{10}$ UFC g^{-1} en

comparación con la cepa parental de tipo silvestre ($P=6,73 \times 10^{-6}$). Se observó un defecto similar para el mutante de *srtA* de la cepa USA300 de SARM (datos no mostrados). El microscopio de barrido electrónico mostró que los mutantes de *srtA* se encontraban sumamente dispersados y a menudo asociados con leucocitos en tejido renal saludable por lo demás. En el día quince a continuación de la infección, los mutantes de *srtA* se eliminaron de los tejidos renales, una reducción $\geq 3,5 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ en comparación con el tipo silvestre (Tabla 3). Por tanto, las proteínas de superficie ancladas por la sortasa A permiten la formación de lesiones de abscesos y la persistencia de bacterias en los tejidos del huésped, en donde los estafilococos se reproducen como comunidades incluidas en una matriz extracelular y protegido de los leucocitos por una pseudocápsula amorfa.

La sortasa A ancla un gran espectro de proteínas con señales de clasificación del motivo LPXTG a la envoltura de la pared celular, proporcionando de ese modo a la superficie de presentación de muchos factores de virulencia (Mazmanian *et al.*, 2002). Para identificar las proteínas de superficie requeridas para la formación de abscesos estafilocócicos, se introdujeron inserciones de *bursa aurealis* en secuencias de codificación 5' de genes que codifican polipéptidos con proteínas del motivo LPXTG (Bae *et al.*, 2004) y estas mutaciones fueron transducidas en *S. aureus* Newman. Las mutaciones en el gen estructural para la proteína A (*spa*) redujo la carga estafilocócica en tejidos de riñón de ratón infectados en un valor $1,004 \log_{10}$ ($P=0,0144$). Cuando se analizaron para determinar su capacidad para formar abscesos en tejidos renales mediante histopatología, se observó que los mutantes de *spa* no fueron capaces de formar abscesos en comparación con la cepa parental de tipo silvestre de *S. aureus* Newman ($4,364 \pm 0,889$ abscesos de *S. aureus* Newman por riñón vs. la mutante de *spa* isogénica con $0,375 \pm 0,374$ lesiones; $P = 0,0356$).

La proteína A bloquea las respuestas inmunes innata y adaptativa. Algunos estudios han identificado la proteína A como un factor de virulencia de vital importancia durante la patogénesis de las infecciones por *S. aureus*. Trabajos anteriores demostraron que la proteína A impide la fagocitosis de los estafilococos uniendo el componente Fc de la inmunoglobulina (Jensen 1958; Uhlén *et al.*, 1984), activa la agregación de plaquetas a través del factor de Von Willebrand (Hartleib *et al.*, 2000), funciona como un superantígeno de linfocitos B capturando la región F(ab)₂ del IgM que lleva VH3 (Roben *et al.*, 1995), y, a través de su activación del TNFR1, puede iniciar la neumonía estafilocócica (Gomez *et al.*, 2004). Debido al hecho de que la proteína A captura la inmunoglobulina y muestra atributos tóxicos, la posibilidad de que esta molécula de superficie puede funcionar como una vacuna en humanos no se ha perseguido rigurosamente. Los inventores demuestran por primera vez que las variantes de proteína A ya no son capaces de unirse a las inmunoglobulinas, vWF y TNFR-1 se eliminan de su potencial toxigénico y son capaces de estimular respuestas inmunes humorales que protegen contra la enfermedad estafilocócica.

Base molecular de la función y presentación de superficie de la proteína A. La proteína A se sintetiza como un precursor en el citoplasma bacteriano y se segrega a través de su péptido de señal YSIK en la pared transversal, es decir, el septo de división celular de los estafilococos (FIG. 1A). (DeDent *et al.*, 2007; DeDent *et al.*, 2008). Después de la escisión de la señal de clasificación LPXTG C-terminal, la proteína A se encuentra anclada a puentes transversales del péptidoglicano bacteriano mediante la sortasa A (Schneewind *et al.*, 1995; Mazmanian *et al.*, 1999; Mazmanian *et al.*, 2000). La proteína A es la proteína de superficie más abundante de los estafilococos; la molécula es expresada por prácticamente todas las cepas de *S. aureus* (Said-Salim *et al.*, 2003; Cespedes *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2008). Los estafilococos giran alrededor de un 15-20% de su pared celular por ciclo de división (Navarre y Schneewind, 1999). Las hidrolasas murinas cortan las cadenas de glicano y los péptidos de pared del péptidoglicano, liberando de este modo la proteína A con su tetrapéptido disacárido unido de la pared celular C-terminal hacia el medio extracelular (Ton-That *et al.*, 1999). Por tanto, mediante su diseño fisiológico, la proteína A es anclada a la pared celular y mostrada sobre la superficie bacteriana, pero también se libera hacia los tejidos circundantes durante la infección del huésped (Marraffini *et al.*, 2006).

La proteína A captura inmunoglobulinas en la superficie bacteriana y esta actividad bioquímica permite el escape estafilocócico de las respuestas inmunes innatas y adquiridas del huésped (Jensen, 1958; Goodyear y Silverman, 2004). De manera interesante, la región X de la proteína A (Guss *et al.*, 1984), un dominio de repetición que une los dominios de unión a IgG a la señal de clasificación LPXTG / anclaje a la pared celular, es quizás la porción más variable del genoma estafilocócico (Schneewind *et al.*, 1992; Said-Salim, 2003). Cada uno de los cinco dominios de unión a la inmunoglobulina de la proteína A (SpA), formados a partir de haces de tres hélices y denominados E, D, A, B, y C, ejerce propiedades funcionales y estructurales similares (Sjodahl, 1977; Jansson *et al.*, 1998). La estructura cristalina y en solución del dominio D se ha resuelto con y sin los ligandos Fc y VH3 (Fab), los cuales se unen a la proteína A de una forma no competitiva en distintos sitios (Graille *et al.*, 2000).

En el complejo de estructura cristalina, la región Fab interactúa con la hélice II y la hélice III del dominio D a través de una superficie compuesta de cuatro cadenas β de la región VH (Graille *et al.*, 2000). El eje mayor de la hélice II del dominio D es de aproximadamente 50° con respecto a la orientación de las cadenas, y la porción interhelicoidal del dominio D es la más proximal a la cadena C0. El sitio de interacción en Fab se encuentra apartado de la región constante de la cadena pesada y la cadena ligera de la Ig. La interacción implica los siguientes residuos del dominio D: Asp-36 de la hélice II, además de Asp-37 y Gln-40 en el bucle entre la hélice II y la hélice HI, además de otros residuos diversos con SpA-D (Graille *et al.*, 2000). Ambas superficies interactuantes están compuestas predominantemente de cadenas laterales polares, con tres residuos de carga negativa en el dominio D y dos

residuos de carga positiva en la Fab 2A2 sumergida por la interacción, lo que proporciona una atracción electroestática global entre las dos moléculas. De las cinco interacciones polares identificadas entre Fab y el dominio D, tres son entre cadenas laterales. Se forma un puente de sal entre Arg-H19 y Asp-36 y se realizan dos enlaces de hidrógeno entre Tyr-H59 y Asp-37 y entre Asn-H82a y Ser-33. Debido a la conservación de Asp-36 y Asp-37 en todos los cinco dominios de unión a IgG de la proteína A, estos residuos fueron seleccionados para la mutagénesis.

Los sitios SpA-D responsables de la unión a Fab se encuentran estructuralmente separados de la superficie del dominio que hace de mediador en la unión a Fc γ . La interacción de Fc γ con el dominio B implica principalmente a los residuos en la hélice I, con una menor implicación de la hélice II (Deisenhofer, 1981; Gouda *et al.*, 1992). Con la excepción de la Gln-32, un contacto de poca importancia en ambos complejos, ninguno de los residuos que hacen de mediadores en la interacción de Fc γ , están implicados en la unión a Fab. Para examinar la relación espacial entre estos diferentes sitios de unión a Ig, los dominios de SpA en estos complejos han sido superpuestos para construir un modelo de un complejo entre Fab, el dominio D de SpA, y la molécula Fc γ . En este modelo ternario, Fab y Fc γ forman una estructura tipo sándwich alrededor de caras opuestas de la hélice II sin evidencia de impedimento estérico de ninguna de las interacciones. Estas observaciones ilustran cómo, a pesar de su pequeño tamaño (es decir, 56-61 aa), un dominio de la SpA puede mostrar simultáneamente ambas actividades, lo que explica la evidencia experimental de que las interacciones de Fab con un dominio individual son no-competitivas. Los residuos para la interacción entre SpA-D y Fc γ son Gln-9 y Gln-10.

En contraste, la ocupación de la porción Fc de la IgG en el dominio D bloquea su interacción con el vWF A1 y probablemente también el TNFR1 (O'Seaghda *et al.*, 2006). Las mutaciones en los residuos esenciales para la unión a Fc de la IgG (F5, Q9, Q10, S11, F13, Y14, L17, N28, 31 y K35) también se requieren para la unión al vWF A1 y al TNFR1 (Cedergren *et al.*, 1993; Gómez *et al.*, 2006; O'Seaghda *et al.*, 2006), mientras que los residuos de vital importancia para la interacción con V β H3 (Q26, G29, F30, S33, D36, D37, Q40, N43, E47) no tienen impacto alguno en las actividades de unión de la Fc, el vWF A1 o el TNFR1 de la IgG (Jansson *et al.*, 1998; Graille *et al.*, 2000). La actividad de unión a Fab de la inmunoglobulina de la proteína A establece como diana un subconjunto de linfocitos B que expresan IgM relacionado con la familia VH3 en su superficie, es decir, estas moléculas funcionan como receptores de linfocitos B de tipo VH3 (Roben *et al.*, 1995). Ante la interacción con la SpA, estos linfocitos B proliferan rápidamente y a continuación se destinan a la apoptosis, lo que conduce a una delección preferencial y prolongada de los linfocitos B de tipo innato (es decir, linfocitos B de la zona marginal y linfocitos B2 foliculares) (Goodyear y Silverman, 2003; Goodyear y Silverman, 2004). Es importante señalar que más del 40% de los linfocitos B circulantes son la diana de la interacción de la proteína A, y la familia VH3 representa la familia más grande de receptores de linfocitos B humanos que imparten respuestas humorales protectoras contra patógenos (Goodyear y Silverman, 2003; Goodyear y Silverman, 2004). Por tanto, la proteína A funciona de forma análoga a los superantígenos estafilocócicos (Roben *et al.*, 1995), a pesar de que esta última clase de moléculas, por ejemplo, SEB, TSST-1, TSST-2, forman complejos con el receptor de linfocitos T para estimular inadecuadamente las respuestas inmunes del huésped y provocando de ese modo características de enfermedad típicas de las infecciones estafilocócicas (Roben *et al.*, 1995; Tiedemann *et al.*, 1995). Estas observaciones en conjunto documentan las contribuciones de la proteína A en cuanto a establecer infecciones estafilocócicas y modular las respuestas inmunes del huésped.

Variante no toxigénica de la proteína A. Los inventores han desarrollado una variante no toxigénica de la proteína A estafilocócica y, con este reactivo en mano, se pusieron como objetivo por primera vez a medir la respuesta inmune de animales a la inmunización de la proteína A. Además, los inventores abordaron la cuestión de si la inmunización de animales con una variante de la proteína A podría generar respuestas inmunes que elevaran la inmunidad protectora contra la infección estafilocócica.

Para alterar las actividades de unión de Fc γ , vWF A1 y TNFR1 a la IgG de la proteína A, se modificaron los residuos 9 y 10 de la glutamina (Q) [la numeración aquí es obtenida a partir de la establecida para el dominio D de la SpA] generando sustituciones de lisina o glicina para ambas glutaminas esperando que estas sustituciones supriman los enlaces de iones formados entre la proteína A de tipo silvestre y sus ligandos. El efecto añadido de las dobles sustituciones de lisina puede ser que estos residuos con carga positiva instituyen una carga repelente para las inmunoglobulinas. Para alterar la unión de Fab VH3 a la IgM, los inventores seleccionaron los residuos de aspartato (D) 36 y 37 de la SpA-D, cada uno de los cuales se requiere para la asociación de la proteína A con el receptor del linfocito B. Los D36 y el D37 fueron ambos sustituidos por alanina. Las mutaciones Q9, 10K y D36, 37A se combinaron en la molécula recombinante SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} y se examinaron para determinar las propiedades de unión de la proteína A.

En breve, la secuencia genómica de la proteína A (spa) de *Staphylococcus aureus* N315 se amplificó mediante PCR con los cebadores (GCTGCACATATGGCGCAACACGATGAAGCTCAAC [cebador5'] (SEQ ID NO:35) y AGTGGATCCTTATGCTTTGTTAGCATCTGC [cebador 3'] (SEQ ID NO:36)), clonados en el vector pET15b (pYSJ1, codones 48-486) (Stranger-Jones, *et al.*, 2006), y el plásmido recombinante se transformó en *E. coli* BL21(DE3) (Studier *et al.*, 1990). El producto de la proteína A obtenido de pYSJ1 alberga los residuos 36-265 de la SpA fusionados al marcador His N-terminal (MGSSHHHHHSSGLVPRGS (SEQ LID NO:37)). Después de la expresión inducible por IPTG, la SpA marcada con His₆ N-terminal recombinante fue purificada por cromatografía de afinidad

sobre resina de Ni-NTA (Stranger-Jones *et al.*, 2006). El dominio D de SpA (SpA-D) fue amplificado por PCR con un par de cebadores específicos (AACATATGTTCAACAAAGATCAACAAAGC [cebador 5'] (SEQ ID NO:38) y AAGGATCCAGATTCGTTTAAATTTTATAGC [cebador 3'] (SEQ ID NO:39)), subclonados en el vector pET15b (pHAN1, codones 212-261 de spa), y el plásmido recombinante se transformó en *E. coli* BL21(DE3) para expresar y purificar la proteína marcada con His₆ N-terminal recombinante. Para generar mutaciones en la secuencia de codificación de SpA-D, se sintetizaron conjuntos de dos pares de cebadores (para las sustituciones de D a A: CTTTCATTCAAAGTCTTAAAGCCGCCCAAGCCAAAGCACTAAC [cebador 5'] (SEQ ID NO:40) y GTTAGTGCTTTGGCTTGGGGCGGCTTTAAGACTTTGAATGAAG [cebador 3'] (SEQ ID NO:41); para sustituciones de Q a K, CATATGTTCAACAAAGATAAAAAAGCGCCTTCTATGAAATC [cebador 5'] (SEQ ID NO:42) y GATTTTCATAGAAGGCGCTTTTATCTTTGTTGAACATATG [cebador 3'] (SEQ ID NO:43); para sustituciones de Q a G, CATATGTTCAACAAAGATGGAGGAAGCGCCTTCTATGAAATC [cebador 5'] (SEQ ID NO:44) y GATTTTCATAGAAGGCGCTTCTCCATCTTTGTTGAACATATG' [cebador 3'] (SEQ ID NO:45). Los cebadores se utilizaron para protocolos de mutagénesis de cambios rápidos. A continuación de la mutagénesis, las secuencias de ADN se confirmaron para cada una de las proteínas recombinantes: SpA, SpA-D y SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}. Todas las proteínas fueron purificadas a partir de lisados de *E. coli* recombinante utilizando cromatografía con Ni-NTA, y posteriormente se dializaron contra PBS y se almacenaron a 4°C.

Para medir la unión de la inmunoglobulina a la proteína A y a sus variantes, se diluyeron 200 µg de proteína purificada en un volumen de 1 ml utilizando un tampón de columna (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7,5), y a continuación se cargó en una columna de Ni-NTA pre-equilibrada (1 ml de volumen del lecho). Las columnas se lavaron con 10 ml de tampón de columna. Se diluyeron 200 µg de IgG humano en un volumen total de tampón de columna de 1 ml y a continuación se aplicó a cada una de las columnas cargadas con proteína A y sus variantes. Las columnas se lavaron posteriormente con 5 ml de tampón de lavado (10 mM de imidazol en tampón de columna) y 5 ml de tampón de columna. Las muestras de proteínas se eluyeron con 2 ml de tampón de elución (500 mM de imidazol en tampón de columna), se recogieron las fracciones y los alícuotas se sometieron a electroforesis en gel SDS-PAGE, seguido de tinción con azul Coomassie. Tal como se muestra en la Figura 1C, la proteína A de tipo silvestre (SpA) y su dominio D de SpA ambos mantuvieron la inmunoglobulina durante la cromatografía. En contraste, la variante de SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} no se unió a la inmunoglobulina.

Para cuantificar la unión de la proteína A y sus variantes a la porción Fc de la inmunoglobulina y el dominio VH3 de Fab, se utilizó inmunoglobulina G humana conjugada con HRP [hIgG], la porción Fc de la IgG humana [hFc] y la porción F(ab)₂ de la IgG humana [hF(ab)₂] además de ensayos ELISA para cuantificar la cantidad relativa de unión a la proteína A y sus variantes. Los datos en la Figura 1D demuestran la unión de SpA y SpA-D a hIgG y hFc, mientras que SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} y SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} mostraron únicamente actividades de unión secundarias. La SpA enlazó cantidades similares de hFc y hF(ab)₂, sin embargo la unión de SpA-D a hF(ab)₂ fue reducida en comparación con la SpA de longitud completa. Este resultado sugiere que la presencia de múltiples dominios de unión a IgG puede aumentar de forma cooperativa la capacidad de la proteína A para unirse al receptor de linfocitos B. Cuando se compara con el reducido poder de unión de SpA-D para hF(ab)₂, de las dos variantes únicamente SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} mostró una reducción significativa en la capacidad para unirse al dominio VH3 de la inmunoglobulina. Para examinar los atributos toxigénicos de SpA-D y sus variantes, se inyectaron proteínas purificadas en ratones, que fueron sacrificados después de 4 horas para extraer sus bazo. El tejido de los órganos fue homogeneizado, se eliminó material capsular y se colorearon linfocitos B con anticuerpos CD19 fluorescentes. A continuación del análisis FACS para cuantificar la abundancia de linfocitos B en tejido esplénico, se observó que la SpA causa una caída del 5% en el conteo de linfocitos B en comparación con un control con mock (PBS) (Figura 1E). En contraste, SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} no causó ninguna reducción en los conteos de linfocitos B, lo que indica que la molécula mutante había perdido sus atributos toxigénicos de estimular la proliferación y muerte de linfocitos B (Figura 1E). En resumen, las sustituciones de aminoácidos en los residuos Q9, Q10, D36, y D37 de la SpA-d suprimieron la capacidad de los dominios de la proteína A para unirse a las inmunoglobulinas o ejercer funciones toxigénicas en tejidos humanos o animales.

Las variantes de la proteína A no toxigénica provocan la protección de la vacuna. Para probar si la proteína A y sus variantes pueden funcionar como antígenos de vacuna o no, se emulsionaron SpA, SpA-D, SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}, y SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} con adyuvante de Freund completo o incompleto y se inmunizaron ratones BALB/c de 4 semanas en el día 1 y en el día 11 con 50 µg de proteína purificada. Se analizaron cohortes de animales (n=5) para determinar las respuestas inmunes a la inmunización mediante sangrado de los animales antes (día 0) y después del esquema de inmunización (día 21). La tabla 4 indica que los ratones inmunizados generaron una modesta respuesta inmune humoral dirigida a la proteína A o a su módulo SpA-D, mientras que la cantidad de anticuerpo generado después de la inmunización con SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} o SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} aumentó de cuatro a cinco veces. Después de la prueba de provocación intravenosa con 1 X 10⁷ UFC de *S. aureus* Newman, los animales se sacrificaron en el día 4, se extrajeron sus riñones y o bien se analizaron para determinar la carga estafilocócica (colocando en placas homogeneizado tisular sobre placas de agar y enumerando las unidades formadoras de colonia, UFC) o realizando histopatología. Tal como se esperaba, los ratones inmunizados con mock (PBS) (n=19) albergaron 6,46 log₁₀ (± 0,25) UFC en el tejido renal y las lesiones infecciosas se organizaron en 3,7 (± 1,2) abscesos por órgano (n=10) (Tabla 4). La inmunización de los animales con SpA condujo a una reducción de 2,51 log₁₀ UFC en el día 5 (P=0,0003) con 2,1 (± 1,2) abscesos por órgano. Los últimos datos indican que no hubo una

reducción significativa en la formación de abscesos ($P=0,35$). La inmunización con SpA-D generó resultados similares: una reducción de $2,03 \log_{10}$ UFC en el día 5 ($P=0,0001$) con $1,5 (\pm 0,8)$ abscesos por órgano ($P=0,15$). En contraste, la inmunización con SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} o SpA-D_{Q9,10G;D36,37A} creó un aumento de la protección, con una reducción de $3,07 \log_{10}$ y $3,03 \log_{10}$ UFC en el día 4, respectivamente (significancia estadística $P<0,0001$ para ambas observaciones). Además, la inmunización tanto con SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} como con SpA-D_{Q9,10G;D36,37A} generó una protección significativa de la formación de abscesos estafilocócicos, ya que solamente se identificaron $0,5 (\pm 0,4)$ y $0,8 (\pm 0,5)$ lesiones infecciosas por órgano ($P=0,02$ y $P=0,04$). La inmunización con variantes de proteína A no toxigénicas genera un aumento de las respuestas inmunes humores para la proteína A y proporciona inmunidad contra la prueba de provocación estafilocócica. Estos datos indican que la proteína A es un candidato ideal para una vacuna humana que prevenga una enfermedad por *S. aureus*.

Estos emocionantes resultados tienen diversas implicaciones para el diseño de una vacuna humana. En primer lugar, la generación de mutaciones por sustitución que afectan a la capacidad de los dominios de unión a inmunoglobulina de la proteína A, ya sea sola o en combinación con dos o más dominios, puede generar variantes no toxigénicas adecuadas para el desarrollo de una vacuna. Parece probable que una combinación de dominios de unión a IgG mutantes que se asemeje mucho a la estructura de la proteína A, pueda generar incluso mejores respuestas humores, tal como se describe aquí para la SpA-dominio D por sí sola. Además, una propiedad probable de los anticuerpos específicos de la proteína A puede ser que la interacción de los sitios de unión del antígeno con la superficie microbiana puede neutralizar la capacidad de los estafilococos de capturar inmunoglobulinas a través de la porción Fc, o de estimular el receptor de linfocitos B a través de las actividades de unión de VH3.

Tabla 4. Variantes de la proteína A no toxigénicos como antígenos de vacunas que previenen la enfermedad por *S. aureus*

Carga bacteriana en el riñón (n=número de ratones)				Título de IgG		Formación de abscesos en ratones (n=número de ratones)			
Antígeno	^a $\log_{10}$ UFC g ⁻¹	^b Reducción	^c Valor P		^d abscesos de superficie	Reducción	^e Histopatología	Reducción	^f Valor P
Mock	6,46±0,25 (n=19)	-	-	<100	14/19 (70%)	-	3,7 ± 1,2 (n=10)	-	-
SpA	3,95±0,56 (n=20)	2,51	0,0003	1706±370	10/20 (50%)	32%	2,1 ± 1,2 (n=10)	2,2	0,35
SpA-D	4,43±0,41 (n=18)	2,03	0,0001	381±27	10/18 (55%)	25%	1,5±0,8 (n=10)	2,2	0,15
SpA-D1	3,39±0,50 (n=19)	3,07	<0,0001	5600±801	6/20 (30%)	59%	0,5±0,4 (n=10)	3,2	0,02
SpA-D2	3,43±0,46 (n=19)	3,03	<0,0001	3980±676	6/19 (32%)	57%	0,8±0,5 (n=10)	2,9	0,04

^aMedias de la carga estafilocócica calculada como $\log_{10}$ UFC g⁻¹ en tejidos renales homogeneizados 4 días a continuación de la infección en cohortes de 18 a 20 ratones BALB/c. Se indica el error estándar de la media ($\pm$ SEM).

^bSe calculó la significancia estadística con la prueba t de Student y los valores P registrados; los valores P <0,05 se consideraron significativos.

^cReducción en la carga bacteriana calculada como $\log_{10}$ UFC g⁻¹.

^dSe midió la formación de abscesos en los tejidos del riñón cuatro días después de la infección mediante inspección macroscópica (% positivo)

^eHistopatología de riñones de diez animales en secciones finas y con tinción de hematoxilina-eosina; se registró la cantidad de abscesos por riñón y se calculó la media para la media final ($\pm$ SEM).

^fSe calculó la significancia estadística con la prueba t de Student y los valores P registrados; los valores P <0,05 se consideraron significativos.

SpA-D1 y SpA-D2 representan SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} y SpA-D_{Q9,10G;D36,37A}, respectivamente.

Protección de la vacuna en abscesos murinos, infección letal murina, y modelos de neumonía murinos. Se han establecido tres modelos de animales para el estudio de la enfermedad infecciosa por *S. aureus*. Estos modelos se utilizan aquí para examinar el nivel de inmunidad protectora proporcionada a través de la generación de los anticuerpos específicos de la proteína A.

Materiales y métodos

Abscesos murinos – se inmunizan ratones BALB/c (hembras de 24 días de edad, 8-10 ratones por grupo, Charles River Laboratories, Wilmingon, MA) mediante inyección intramuscular en la pata trasera con proteína purificada (Chang *et al.*, 2003; Schneewind *et al.*, 1992). Se administra SpA, SpA-D o SpA-DQ9,10K;D36,37A purificada (50 µg de proteína) en los días 0 (emulsionada en una relación 1:1 con adyuvante completo de Freund) y 11 (emulsionada en una relación 1:1 con adyuvante incompleto de Freund). Se extraen muestras de sangre mediante sangrado retroorbital en los días 0, 11, y 20. Se examinan los sueros mediante ELISA para determinar los títulos de IgG para las actividades de unión específica de SpA-D y SpA-DQ9,10K;D36,37A. Los animales inmunizados se someten a una prueba de provocación en el día 21 mediante inyección retroorbital de 100 µl de una suspensión de *S. aureus* Newman o *S. aureus* USA300 (1×10^7 ufc). Para ello, se diluyen cultivos de toda la noche de *S. aureus* Newman en una relación 1:100 en caldos de soya triptica frescos y se cultivaron durante 3 h a 37°C. Los estafilococos se centrifugan, se lavan dos veces y se diluyen en PBS para producir un A_{600} de 0,4 (1×10^8 ufc por ml). Se verifican las diluciones de forma experimental mediante colocación en placas de agar y formación de colonias. Los ratones se anestesian por inyección intraperitoneal de 80-120 mg of ketamina y 3-6 mg de xilacina por kilogramo de peso corporal y se infectaron mediante inyección retroorbital. En el día 5 o 15 a continuación de la prueba de provocación, se practica la eutanasia a los ratones mediante inhalación de CO₂ comprimido. Los riñones son extraídos y homogeneizados en 1% Triton X-100. Los alícuotas se diluyen y se colocan en placas sobre medio de agar para la determinación por triplicado de las ufc. Para la histología, el tejido renal se incubó a temperatura ambiente en in 10% de formalina durante 24 h. Los tejidos se incluyen en parafina, se preparan en secciones finas, y se colorean con tinción de hematoxilina-eosina, y se examinaron mediante microscopía.

Infección letal murina - se inmunizan ratones BALB/c (hembras de 24 días de edad, 8-10 ratones por grupo, Charles River Laboratories, Wilmingon, MA) mediante inyección intramuscular en la pata trasera con proteína SpA, SpA-D o SpA-DQ9,10K;D36,37A purificada (50 µg de proteína). La vacuna se administra en los días 0 (emulsionada en una relación 1:1 con adyuvante completo de Freund) y 11 (emulsionada en una relación 1:1 con adyuvante incompleto de Freund). Se extraen muestras de sangre mediante sangrado retroorbital en los días 0, 11, y 20. Se examinan los sueros mediante ELISA para determinar los títulos de IgG para la actividad de unión específica de SpA-D y SpA-DQ9,10K;D36,37A. Los animales inmunizados se someten a una prueba de provocación en el día 21 mediante inyección retroorbital de 100 µl de una suspensión de *S. aureus* Newman o *S. aureus* USA300 (15×10^7 ufc) (34). Para ello, se diluyen cultivos de toda la noche de *S. aureus* Newman en una relación 1:100 en caldo de soya triptica fresco y se cultivaron durante 3 h a 37°C. Los estafilococos se centrifugan, se lavan dos veces y se diluyen en PBS para producir un A_{600} de 0,4 (1×10^8 ufc por ml) y se concentraron. Se verifican las diluciones de forma experimental mediante colocación en placas de agar y formación de colonias. Los ratones se anestesian por inyección intraperitoneal de 80-120 mg of ketamina y 3-6 mg de xilacina por kilogramo de peso corporal. Los animales inmunizados se someten a prueba de provocación en el día 21 mediante inyección intraperitoneal con 2×10^{10} ufc de *S. aureus* Newman de $3-10 \times 10^9$ ufc de aislados de *S. aureus* clínico. Los animales son monitorizados durante 14 días, y se registra la enfermedad letal.

Modelo de neumonía murino – Se cultivan cepas de *S. aureus* Newman o USA300 (LAC) a 37°C en caldo de soja triptica/agar para OD₆₆₀ 0,5. Se centrifugan 50-ml alícuotas del cultivo, se lavan en PBS, y se suspenden en 750 µl de PBS para realizar estudios de mortalidad ($3-4 \times 10^8$ UFC por un volumen de 30-µl), o 1.250 µl de PBS (2×10^8 UFC por volumen de 30-µl) para experimentos de carga bacteriana e histopatología (2, 3). Para la infección del pulmón, se anestesian ratones C57BL/6J de 7 semanas de vida (The Jackson Laboratory) antes de la inoculación de 30 µl de suspensión de *S. aureus* en la fosa nasal izquierda. Los animales se introducen en la jaula en posición supina para su recuperación y se observaron durante 14 días. Para la inmunización activa, ratones de 14 semanas de vida reciben 20 µg de SpA-D o SpA-DQ9,10K;D36,37A en CFA (adyuvante completo de Freund) en el día 0 por vía i.m., seguido de un refuerzo con 20 µg de SpA-D o SpA-DQ9,10K;D36,37A en adyuvante incompleto de Freund (IFA) en el día 10. Los animales se someten a prueba de provocación con *S. aureus* en el día 21. Se recogen los sueros antes de la inmunización en el día 20 para evaluar la producción de anticuerpos específicos. Para estudios de inmunización pasiva, ratones de 7 semanas de vida reciben 100 µl de NRS (suero normal de conejo) o bien antisuero de conejo específico de SpA-D por inyección i.p. 24 h antes de la prueba de provocación. Para evaluar las correlaciones patológicas de la neumonía, los animales infectados se sacrifican mediante inhalación de CO₂ forzada antes de la extracción de ambos pulmones. El pulmón derecho es homogeneizado para la enumeración de la carga bacteriana. El pulmón izquierdo se coloca en formalina al 1% y se incluye en parafina, se prepara en secciones finas, se colorea con hematoxilina-eosina, y se analiza mediante microscopía.

Anticuerpos de conejo. – Se utiliza 200 SpA-D o SpA-DQ9,10K;D36,37A purificada como inmunógeno para la producción de antisuero de conejo. Se emulsiona 200 µg de proteína con CFA para su inyección en el día 0, seguido de inyecciones de refuerzo con 200 µg de proteína emulsionada con IFA los días 21 y 42. Los títulos de anticuerpos de conejo se determinan mediante ELISA. Se obtienen anticuerpos purificados mediante cromatografía por afinidad de suero de conejo en SpA-D o SpA-DQ9,10K;D36,37A seferosa. La concentración de anticuerpos eluidos se mide mediante absorbancia en A₂₈₀ y los títulos de anticuerpos específicos se determinan mediante ELISA.

Inmunización activa con variantes de SpA-dominio D. – Para determinar la eficacia de la vacuna, los animales se inmunizan de forma activa con SPA-D o SpAD_{Q9,10K;D36,37A} purificada. Como control, los animales se inmunizan solo con adyuvante. Se determinan los títulos de anticuerpos contra las preparaciones de proteína A utilizando SPA-D o SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} como antígenos; ha de señalarse que la variante de SpAD_{Q9,10K;D36,37A} no puede unirse a la porción Fc o Fab de la IgG. Utilizando los modelos de enfermedades infecciosas descritos anteriormente, se mide cualquier reducción en la carga bacteriana (abscesos murinos y neumonía), evidencia de histopatología de la enfermedad estafilocócica (abscesos murinos y neumonía) y protección de la enfermedad letal (prueba de provocación letal murina y neumonía).

Inmunización pasiva con anticuerpos policlonales de conejo purificados por afinidad generados contra las variantes de SpA-dominio D. – Para determinar la inmunidad protectora de los anticuerpos de conejo específicos de la proteína A, los ratones se inmunizan de forma pasiva con 5 mg/kg SPA-D o SpAD_{Q9,10K;D36,37A} purificada obtenida de anticuerpos de conejo. Ambas preparaciones de anticuerpos se purifican mediante cromatografía de afinidad utilizando SPA-D o SpA-D_{Q9,10K;D36,37A}. Como control, los animales se inmunizan de forma pasiva con anticuerpos rV10 (un antígeno de protección contra plagas que no tiene impacto alguno en el resultado de las infecciones estafilocócicas). Se determinan los títulos de anticuerpos contra todas las preparaciones de proteína A utilizando SpA-D_{Q9,10K;D36,37A} como antígeno, y esta variante no puede unirse a la porción Fc o Fab de la IgG. Utilizando los modelos de enfermedades infecciosas descritos anteriormente, se mide la reducción en la carga bacteriana (abscesos murinos y neumonía), evidencia de histopatología de la enfermedad estafilocócica (abscesos murinos y neumonía) y la protección de la enfermedad letal (prueba de provocación letal murina y neumonía).

Ejemplo 2

Vacuna de proteína A no toxigénica para una infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Los aislados clínicos de *S. aureus* expresan la proteína A (Shopsin *et al.*, 1999, cuyo producto de traducción primario está compuesto por un péptido señal N-terminal (DeDent *et al.*, 2008), cinco dominios de unión a Ig (Ig-BD) (denominados E, D, A, B y C) (Sjodahl, 1977), una región X con repeticiones variables de un péptido de ocho residuos (Guss *et al.*, 1984), y una señal de clasificación C-terminal para el anclaje de la pared celular de SpA (Schneewind *et al.*, 1992; Schneewind *et al.*, 1995) (FIG. 1A-1B). Guiada por la homología de aminoácidos (Uhlen *et al.*, 1984), la estructura de haz de triple hélice α de los IgBDs (Deisenhofer *et al.*, 1978; Deisenhofer *et al.*, 1981) y sus interacciones atómicas con Fab V_H3 (Graille *et al.*, 2000) o Fc γ (Gouda *et al.*, 1998), se seleccionó la glutamina 9 y la 10, además de aspartato 36 y 37 como de vital importancia para la asociación de SpA con anticuerpos o receptor de linfocitos B respectivamente. Las sustituciones Gln9Lys, Gln10Lys, Asp36Ala y Asp37Ala fueron introducidas en el dominio D para generar SPA-D_{KKAA} (FIG. 1B). La capacidad de la SpA-D o SpA-D_{KKAA} para unirse a la IgG humana fue analizada mediante cromatografía de afinidad (FIG. 1D). La SpA-D marcada con Polihistidina además de la SpA de longitud completa mantuvo el IgG humano en Ni-NTA, mientras que SPA-D_{KKAA} y un control negativo (SrtA) no (FIG. 1C). Un resultado similar se observó con el factor de von Willebrand (Hartleib *et al.*, 2000), el cual, junto con el receptor del factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1)(Gomez *et al.*, 2004), puede también unirse a la proteína A a través de la glutamina 9 y 10 (FIG. 1D). La inmunoglobulina humana abarca un 60-70% de IgG de tipo VH3 humana. Los inventores distinguen entre el dominio Fc y la activación del receptor de linfocitos B de las Igs, y midieron la asociación de los fragmentos de Fc γ y F(ab)₂ humano, ambos de los cuales se unieron a la SpA o SpA-D de longitud completa, pero no a la SPA-D_{KKAA} (FIG. 1D). La inyección de SpA-D en la cavidad peritoneal de los ratones dio como resultado la expansión de linfocitos B seguida del colapso apoptótico de linfocitos CD19+ en tejido del bazo de ratones BALB/c (Goodyear y Silverman, 2003)(FIG. 1E). No se observó actividad de superantígenos de linfocitos B a continuación de la inyección con SpA-D_{KKAA}, y la tinción de TUNEL de tejido esplénico no detectó el aumento en células apoptóticas que siguen a la inyección de SpA o SpA-D (FIG. 1E).

Anticuerpos contra SpA-D_{KKAA} protegen contra infecciones por SASM y SARM. Se inyectaron en cada uno de los ratones BALB/c naive de seis semanas de vida 50 μ g de SpA, SpA-D o SpA-D_{KKAA} emulsionado en CFA y reforzado con el mismo antígeno emulsionado en IFA. En concordancia con la hipótesis de que la SpA-D promueve el colapso apoptótico de las poblaciones de linfocitos B clonales activados, los inventores observaron un título diez veces mayor de anticuerpos específicos de SpA-D_{KKAA} después de la inmunización de ratones con la variante no toxigénica en comparación con el superantígeno de linfocitos B (SpA-D vs. SpA-D_{KKAA} P <0,0001, Tabla 5). Los títulos de anticuerpos generados por la inmunización con la SpA de longitud completa fueron más elevados que los generados por la SpA-D (P=0,0022), lo cual probablemente se debe al mayor tamaño y estructura del dominio reiterativa de este antígeno (Tabla 5). No obstante, incluso la SpA provocó títulos de anticuerpos inferiores a la SpA-D_{KKAA} (P=0,0003), que abarca únicamente 50 aminoácidos de la proteína A (520 residuos, SEQ ID NO:33). Los ratones inmunizados se sometieron a una prueba de provocación por inoculación intravenosa con *S. aureus* Newman y se examinó la capacidad de los estafilococos para diseminar abscesos en tejidos renales mediante necropsia cuatro días después de la prueba de provocación. En tejido renal homogeneizado de ratones inmunizados con mock (PBS/adyuvante), se enumeró una carga estafilocócica media de 6,46 log₁₀ UFC g⁻¹ (Tabla 5). La inmunización de ratones con SpA o SpA-D condujo a la reducción de la carga estafilocócica, sin embargo los animales vacunados con SpA-D_{KKAA} mostraron una reducción incluso mayor, de 3,07 log₁₀ UFC g⁻¹ de *S. aureus* Newman en tejidos renales (P <0,0001, Tabla 5). La formación de abscesos en riñones se analizó mediante

histopatología (FIG. 2). Los animales inmunizados con mock albergaron una media de 3,7 ($\pm 1,2$) abscesos por riñón (Tabla 5). La vacunación con SpA-D_{KKAA} redujo la cantidad media de abscesos a 0,5 ($\pm 0,4$) ($P=0,0204$), mientras que la inmunización con SpA o SpA-D no causó una reducción significativa en la cantidad de lesiones de abscesos (Tabla 5). Las lesiones de los animales vacunados con SpA-D_{KKAA} fueron menores en tamaño, con menos PMNs infiltrantes y carecían, de forma característica, de comunidades de abscesos estafilocócicos (Cheng *et al.*, 2009) (FIG. 2). Los abscesos en los animales que habían sido inmunizados con SpA o SpA-D mostraron la misma estructura general de las lesiones en animales inmunizados con mock (FIG. 2).

Los inventores examinaron si la inmunización con SpA-D_{KKAA} puede proteger los ratones contra las cepas SARM y seleccionaron el aislado USA300 LAC para realizar la prueba de provocación a los animales (Diep *et al.*, 2006). Esta cepa CA-SARM sumamente virulenta se extendió rápidamente a través de los Estados Unidos, causando una morbilidad y mortalidad (Kennedy *et al.*, 2008). En comparación con los ratones de control con adyuvante, los animales inmunizados con SpA-D_{KKAA} albergaron una reducción en la carga bacteriana de los tejidos renales infectados de $1,07 \log_{10}$ UFC g⁻¹. El examen de la histopatología del tejido renal a continuación de la prueba de provocación con *S. aureus* USA300 reveló que la cantidad media de abscesos fue reducida de 4,04 ($\pm 0,8$) a 1,6 ($\pm 0,6$) ($P=0,02774$). En contraste, la inmunización con SpA o SpA-D no causó una reducción significativa en la carga bacteriana o en la formación de abscesos (Tabla 5).

Los anticuerpos de SpA-D_{KKAA} previenen la interacción inmunoglobulina-proteína A. Se inmunizaron conejos con SpAD_{KKAA} y los anticuerpos específicos se purificaron en columna de afinidad con SpA-D_{KKAA} seguido de SDS-PAGE (FIG. 3). La IgG específica de SpA-D_{KKAA} se cortó con pepsina para generar fragmentos Fc γ y F(ab)₂, la última de las cuales se purificó mediante cromatografía en columna de SpA-D_{KKAA} (FIG. 3). La unión de la IgG humana o el vWF a la SpA o SpA-D se vio alterada por F(ab)₂ específico de SpAD_{KKAA}, lo que indica que los anticuerpos obtenidos de SpA-D_{KKAA} neutralizan la función de superantígeno de los linfocitos B de la proteína A, además de sus interacciones con Ig (FIG. 3).

SpA_{KKAA} genera respuestas inmunes protectoras mejoradas. Para mejorar adicionalmente las propiedades de la vacuna para la proteína A no toxigénica, los inventores generaron SpA_{KKAA}, que incluye todos los cinco IgBDs con cuatro sustituciones de aminoácidos – sustituciones que corresponden a Gln9Lys, Gln10Lys, Asp36Ala y Asp37Ala del dominio D – en cada uno de sus cinco dominios (E, D, A, B y C). Se purificó la SpA_{KKAA} marcada con polihistidina mediante cromatografía de afinidad y se analizó mediante SDS-PAGE con tinción con azul Coomassie (FIG. 4). Al contrario que la SpA de longitud completa, la SpA_{KKAA} no se une a la IgG humana, Fc y F(ab)₂ o al vWF (FIG. 4). La SpA_{KKAA} no mostró actividad superantigénica de los linfocitos B, ya que la inyección de la variante en los ratones BALB/c no causó una depleción de los linfocitos B CD19+ en tejido esplénico (FIG. 4). La vacuna de SpA_{KKAA} generaron títulos de anticuerpos específicos más elevados que la inmunización con SpA-D_{KKAA} y proporcionó ratones con una elevada protección contra la prueba de provocación con *S. aureus* USA300 (Tabla 5). Cuatro días después de la prueba de provocación, los animales vacunados con SpA_{KKAA} albergaron $3,54 \log_{10}$ UFC g⁻¹ menos estafilococos en tejidos renales ($P=0,0001$) y también causó una reducción mayor en la cantidad de lesiones de abscesos ($P=0,0109$) (Tabla 5). Como prueba de si las vacunas de proteína A tienen un impacto en otras cepas de SARM, se sometió a prueba de provocación a ratones con el aislado Japonés de SARM resistente a vancomicina Mu50 (Hiramatsu *et al.*, 1997). De forma similar a los datos observados con el aislado de SARM USA300, los animales vacunados con SpA_{KKAA} albergaron menos estafilococos de Mu50 en los tejidos renales que los animales inmunizados con mock ($P=0,0248$, FIG. 7).

La transferencia pasiva de anticuerpos específicos de SpA previene la enfermedad estafilocócica. Se utilizó SpA_{KKAA} para inmunizar conejos. Los anticuerpos de conejo específicos para SpA-D_{KKAA} o SpA_{KKAA} se purificaron por afinidad en matrices con un antígeno afín inmovilizado e inyectado a una concentración de 5 mg por kg⁻¹ de peso corporal en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c (Tabla 6). Veinticuatro horas después, se determinaron títulos de anticuerpos específicos en suero y se sometió a los animales a una prueba de provocación por inoculación intravenosa con *S. aureus* Newman. La transferencia pasiva redujo la carga estafilocócica en tejidos de riñón para anticuerpos específicos de SpA-D_{KKAA} ($P=0,0016$) o SpA_{KKAA} ($P=0,0005$). Al realizar el examen de histopatología, ambos anticuerpos redujeron la abundancia de lesiones de abscesos en los riñones de ratones sometidos a prueba de provocación con *S. aureus* Newman (Tabla 6). Estos datos en conjunto revelan que la protección de la vacuna a continuación de la inmunización con SpA-D_{KKAA} o SpA_{KKAA} es conferida por parte de anticuerpos que neutralizan la proteína A.

Los inventores además buscaban determinar si los anticuerpos específicos de la proteína A pueden proteger a los animales contra una prueba de provocación letal. Se inmunizaron ratones BALB/c de forma activa o pasiva para generar anticuerpos contra SpA_{KKAA} y a continuación se sometieron a prueba de provocación mediante inyección intraperitoneal con dosis letales de *S. aureus* Newman (FIG. 6). Los anticuerpos contra la SpA_{KKAA}, ya se hayan generado mediante inmunización activa ($P=0,0475$, SpA_{KKAA} vs. mock) o pasiva ($P=0,0493$, SpA_{KKAA} vs. mock), confirieron protección contra la prueba de provocación letal con *S. aureus* Newman (FIG. 6).

Tabla 5. Inmunización activa de ratones con vacunas de proteína A

Carga estafilocócica y formación de abscesos en tejido renal						
Antígeno	^a log ₁₀ UFC g ⁻¹	^b Valor P	^c Reducción (log ₁₀ UFC g ⁻¹)	^d Título de IgG	^e Número de abscesos	^b Valor P
Prueba de provocación <i>S. aureus</i> Newman						
Mock	6,46 ± 0,25	-	-	<100	3,7 ± 1,2	-
SpA	3,95 ± 0,56	0,0003	2,51	1706 ± 370	2,1 ± 1,2	0,3581
SpA-D	4,43 ± 0,41	0,0001	2,03	381 ± 27	1,5 ± 0,8	0,1480
SpA-D _{KKAA}	3,39 ± 0,50	<0,0001	3,07	5600 ± 801	0,5 ± 0,4	0,0204
Prueba de provocación con <i>S. aureus</i> USA300 (LAC)						
Mock	7,20 ± 0,24	-	-	<100	4,0 ± 0,8	-
SpA	6,81 ± 0,26	0,2819	0,39	476 ± 60	3,3 ± 1,0	0,5969
SpA-D	6,34 ± 0,52	0,1249	0,86	358 ± 19	2,2 ± 0,6	0,0912
SpA-D _{KKAA}	6,00 ± 0,42	0,0189	1,20	3710 ± 1147	1,6 ± 0,6	0,0277
SpA-K _{KKAA}	3,66 ± 0,76	0,0001	3,54	10200 ± 2476	1,2 ± 0,5	0,0109

^aMedias de la carga estafilocócica calculada como log₁₀ UFC g⁻¹ en tejidos renales homogeneizados 4 días a continuación de la infección en cohortes de quince a veinte ratones BALB/c por inmunización. Se muestra una representación de tres experimentos en animales independientes y reproducibles. Se indica el error estándar de la media (±SEM).

^bSe calculó la significancia estadística con la prueba *t* de Student bilateral desapareada y los valores P registrados; los valores P <0,05 se consideraron significativos.

^cReducción en la carga bacteriana calculada como log₁₀ UFC g⁻¹.

^dLas medias de cinco títulos de IgG en suero elegidos aleatoriamente se midieron previamente a la infección estafilocócica mediante ELISA.

^eHistopatología de riñones de diez animales en secciones finas y con tinción de hematoxilina-eosina; se registró la cantidad media de abscesos por riñón y se registró y se calculó la media nuevamente para la media final (±SEM).

Tabla 6. Inmunización pasiva de ratones con anticuerpos contra la proteína A

Carga estafilocócica y formación de abscesos en tejido renal						
^a Antígeno	^b log ₁₀ UFC g ⁻¹	^c Valor P	^d Reducción (log ₁₀ UFC g ⁻¹)	^e Título de IgG	^f Número de abscesos	^c Valor P
Mock	7,10 ± 0,14	-	-	<100	4,5 ± 0,8	-
α-SpA-D _{KKAA}	5,53 ± 0,43	0,0016	1,57	466 ± 114	1,9 ± 0,7	0,0235
α-SpA-K _{KKAA}	5,69 ± 0,34	0,0005	1,41	1575 ± 152	1,6 ± 0,5	0,0062

^aSe inyectaron anticuerpos purificados por afinidad en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c en una concentración de 5 mg kg⁻¹ veinticuatro horas antes de la prueba de provocación con 1 X 10⁷ UFC de *S. aureus* Newman.

^bMedias de la carga estafilocócica calculada como log₁₀ UFC g⁻¹ en tejidos renales homogeneizados 4 días a continuación de la infección en cohortes de quince ratones BALB/c por inmunización. Se muestra una representación de tres experimentos en animales independientes y reproducibles. Se indica el error estándar de la media (±SEM).

^cSe calculó la significancia estadística con la prueba *t* de Student bilateral y desapareada y los valores P se registraron; los valores P <0,05 se consideraron significativos.

^dReducción en la carga bacteriana calculada como log₁₀ UFC g⁻¹.

^eLas medias de cinco títulos de IgG en suero elegidos aleatoriamente se midieron previamente a la infección estafilocócica mediante ELISA.

^fHistopatología de riñones de diez animales en secciones finas y con tinción de hematoxilina-eosina; se registró la cantidad de abscesos media por riñón y se calculó la media nuevamente para la media final (±SEM).

- 5 **La respuesta inmune a la proteína A a continuación de la infección estafilocócica o la inmunización con SpA_{KKAA}.** A continuación de la infección con *S. aureus* virulento, los ratones no desarrollan inmunidad protectora contra la posterior infección con la misma cepa (Burts *et al.*, 2008) (FIG. 8). La abundancia media de IgG específico de SpA-D_{KKAA} en estos animales se determinó por dot blot como 0,20 µg ml⁻¹ (±0,04) y 0,14 µg ml⁻¹ (±0,01) para

cepas Newman y USA300 LAC, respectivamente (FIG. 4). Se calculó la concentración mínima de IgG específico de proteína A requerido para la protección contra la enfermedad en animales vacunados con SpA_{KKAA} o SpA-D_{KKAA} (reducción de $P = 0,05 \log_{10}$ en las UFC g^{-1} de tejido renal estafilocócico) como $4,05 \mu g \text{ ml}^{-1}$ ($\pm 0,88$). La concentración media en suero de IgG específico de SpA en voluntarios humanos saludables adultos ($n=16$) fue de $0,21 \mu g \text{ ml}^{-1}$ ($\pm 0,02$). Por tanto, las infecciones por *S. aureus* en ratones o humanos no están asociadas con las respuestas inmunes que generan niveles significativos de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la proteína A, que es probable que se deba a las propiedades superantigénicas de los linfocitos B de esta molécula. En contraste, la concentración media en suero de la IgG específica para la toxina de la difteria en voluntarios humanos, $0,068 \mu g \text{ ml}^{-1}$ ($\pm 0,20$), se situó dentro del rango para la inmunidad protectora contra la difteria (Behring, 1890; Lagergard *et al.*, 1992).

Los aislados clínicos de *S. aureus* expresan la proteína A, un factor de virulencia esencial cuya actividad del superantígeno de linfocitos B y propiedades evasivas hacia el aclaramiento opsonó-fagocítico son absolutamente necesarias para la formación de abscesos estafilocócicos (Palmqvist *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2009; Silverman y Goodyear, 2006). Por tanto la proteína A puede considerarse como una toxina, esencial para la patogénesis, cuyas propiedades moleculares deben ser neutralizadas para lograr inmunidad protectora. Generando variantes no toxigénicas no capaces de unirse a las Ig a través de los dominios Fc γ o VH₃-Fab, los inventores miden aquí por primera vez las respuestas inmunes neutralizantes de la proteína A como una correlación para la inmunidad protectora contra la infección por *S. aureus*. En contraste con muchas cepas sensibles a la meticilina, el aislado USA300 LAC de CA-SARM es significativamente más virulento (Cheng *et al.*, 2009). Por ejemplo, la inmunización de los animales de los experimentos con la proteína de superficie IsdB (Kuklin *et al.*, 2006; Stranger-Jones *et al.*, 2006) genera anticuerpos que confieren protección contra *S. aureus* Newman (Stranger-Jones *et al.*, 2009) pero no contra la prueba de provocación con USA300.

Materiales y métodos

Cepas y crecimiento bacteriano. Las cepas de *Staphylococcus aureus* Newman y USA300 se cultivaron en caldo de soja triptica (TSB) a 37°C. Las cepas de *Escherichia coli* DH5 α y BL21 (DE3) se cultivaron en caldo Luria-Bertani (LB) con $100 \mu g \text{ ml}^{-1}$ de ampicilina a 37°C.

Anticuerpos de conejo. La secuencia de codificación para SpA se amplificó por PCR con dos cebadores, gctgcacatattggcgcaacacgatgaagctcaac (SEQ ID NO:35) y agtggatccttatgcttgagctttgttagcatctgc (SEQ ID NO:36) utilizando ADN modelo de *S. aureus* Newman. La SpA-D fue amplificada por PCR con dos cebadores, aacatattgttcaa.caaagatcaacaaagc (SEQ ID NO:38) y aaggatccagattcggttaatttttagc (SEQ ID NO:39). La secuencia para SpA-D_{KKAA} se sometió a mutagénesis con dos conjuntos de cebadores catattgttcaacaaagataaaaaagcgcttctatgaaatc (SEQ ID NO:42) y gatttcatagaaggcgctttttatctttgtgaacatag (SEQ ID NO:43) para Q9K, Q10K además de ctctattcaaaagctttaaagccgcccaagccaaagcactaac (SEQ ID NO:40) y gttagtcttggcttggggcggttaagactttgaatgaag (SEQ ID NO:41) para D36A,D37A. La secuencia de SpA_{KKAA} fue sintetizada por Integrated DNA Technologies, Inc. Los productos de la PCR se clonaron en pET-15b generando una proteína recombinante marcada con His₆ N-terminal. Los plásmidos se transformaron en BL21(DE3). Los cultivos de toda la noche de los transformantes se diluyeron en una relación 1:100 en medio fresco y se cultivaron a 37°C hasta un OD₆₀₀ 0,5, punto en el que los cultivos fueron inducidos con 1 mM isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y cultivados durante tres horas más. Las células bacterianas se sedimentaron mediante centrifugación, se suspendieron en un tampón de columna (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) y se rompieron con una prensa French a 14.000 psi. Se eliminó de los lisados la membrana y los componentes insolubles mediante ultracentrifugación a 40.000 Xg. Las proteínas en el lisado soluble estaban sometidas a cromatografía de afinidad con ácido níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA, Qiagen). Las proteínas se eluyeron en tampón de columna que contiene concentraciones sucesivamente más elevadas de imidazol (100-500 mM). Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante ensayo del ácido bicinonínico (BCA) (Thermo Scientific). Para la generación de anticuerpos, se inmunizaron conejos (6 meses de vida, Nueva Zelanda blancos, hembras, Charles River Laboratories) con 500 μg de proteína emulsionada en adyuvante completo de Freund (Difco) mediante inyección subcapsular. Para inmunizaciones de refuerzo, las proteínas se emulsionaron en Adyuvante incompleto de Freund y se inyectaron 24 o 48 días después de la inmunización inicial. En el día 60, los conejos se desangraron y se recuperó el suero.

Aislamiento de anticuerpos. El antígeno purificado (5 mg de proteína) se enlazó covalentemente a columnas HP de HiTrap activada por NHS (GE Healthcare). Se utilizó antígeno-matriz para la cromatografía de afinidad de 10-20 ml de suero de conejo a 4°C. La matriz cargada se lavó con 50 volúmenes de columna de PBS, se eluyeron los anticuerpos con un tampón de elución (1 M glicina, pH 2,5, 0,5 M NaCl) y se neutralizó inmediatamente con 1M Tris-HCl, pH 8,5. Los anticuerpos purificados se dializaron durante toda la noche contra PBS a 4°C.

Fragmentos F(ab)₂. Se mezclaron anticuerpos purificados por afinidad con 3 mg de pepsina a 37°C durante 30 minutos. La reacción se extinguió con 1 M Tris-HCl, pH 8,5 y se purificaron por afinidad fragmentos F(ab)₂ con columnas HP de HiTrap activadas por NHS conjugadas con antígenos específicos. Se dializaron anticuerpos purificados contra PBS a 4°C, se cargaron en gel SDS-PAGE y se visualizaron con tinción de azul Coomassie.

Inmunización activa y pasiva. Se inmunizaron ratones BALB/c (de 3 semanas de vida, hembras, Charles River Laboratories) con 50 µg de proteína emulsionada en adyuvante de Freund completo (Difco) por inyección intramuscular. Para inmunizaciones de refuerzo, se emulsionaron proteínas en adyuvante de Freund incompleto y se inyectaron 11 días después de la inmunización inicial. En el día 20 a continuación de la inmunización, se desangraron 5 ratones para determinar los títulos mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Se inmunizaron ratones BALB/c mediante inyección intramuscular y se reforzaron con el mismo antígeno en Alum después de 11 y 25 días. En el día 34, los ratones se desangraron para obtener suero para títulos de anticuerpos específicos. Los anticuerpos purificados por afinidad se inyectaron en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c bien 24 horas o 4 horas antes de la prueba de provocación subletal o letal, respectivamente. La sangre del animal se recogió por punción en la vena periorbital y los títulos de anticuerpos de suero específicos se midieron mediante ELISA.

Abscesos renales de ratón. Cultivos de toda la noche de *S. aureus* Newman o USA300 (LAC) se diluyeron en una relación 1:100 en TSB fresco y se cultivaron durante 2 horas a 37°C. Los estafilococos se sedimentaron, se alvaron y se suspendieron en PBS a OD₆₀₀ de 0,4 (~1 X 10⁸ UFC ml⁻¹). Los inóculos fueron cuantificados extendiendo muestras de alicuotas en TSA y enumerando las colonias formadas. Se anestesiaron ratones BALB/c (de 6 semanas de vida, hembras, Charles River Laboratories) mediante inyección intraperitoneal con 100 mg ml⁻¹ ketamina y 20 mg ml⁻¹ xilacina por kilogramo de peso corporal. Los ratones fueron infectados mediante inyección retroorbital con 1 X 10⁷ UFC de *S. aureus* Newman o 5 X 10⁶ UFC de *S. aureus* USA300. En el día 4 después de la prueba de provocación, los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂. Ambos riñones fueron extraídos, y se analizó la carga estafilocócica en un órgano homogeneizando el tejido renal con PBS, 1% Triton X-100. Diluciones en serie del homogeneizado se extendieron en TSA y se incubaron para formación de colonias. El órgano restante se examinó mediante histopatología. Brevemente, los riñones se fijaron en formalina al 10% durante 24 horas a temperatura ambiente. Los tejidos se incluyeron en parafina, se prepararon en secciones finas, y se colorearon con hematoxilina-eosina, y se inspeccionaron por microscopía óptica para enumerar las lesiones de abscesos. Todos los experimentos con ratón se realizaron de acuerdo a las directrices institucionales, siguiendo el informe de protocolo experimental y la aprobación del Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (IACUC) en la Universidad de Chicago.

Infección de ratones. Se utilizaron estafilococos para infectar ratones anestesiados mediante inyección retroorbital (1 x 10⁷ UFC de *S. aureus* Newman, 5 x 10⁶ UFC de *S. aureus* USA300 o 3 x 10⁷ UFC de *S. aureus* Mu50). En el día 4, 15 o 30, los ratones fueron sacrificados, los riñones fueron extraídos, y el tejido homogeneizado se extendió sobre agar para formación de colonias. El tejido del órgano se preparó en secciones finas, se coloreó con hematoxilina-eosina, y se inspeccionó mediante microscopía. Los experimentos con animales fueron realizados de acuerdo con las directrices institucionales, siguiendo el informe de protocolo experimental y la aprobación del Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) y el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (IACUC) en la Universidad de Chicago.

Para los experimentos con prueba de provocación letal, se inyectó a ratones BALB/c (cohortes de 8-10 animales por experimento) una suspensión de 2-6 x 10⁸ UFC de *S. aureus* Newman o su variante Δspa isogénica en la cavidad peritoneal. La supervivencia animal fue monitorizada durante un periodo de 15 días y la significancia estadística de los datos de supervivencia fue analizada con el test log-rango.

Unión de la proteína A. Para la unión a la IgG humana, se precargaron columnas de afinidad con Ni-NTA con 200 µg de proteínas purificadas (SpA, SpA-D, SpA-D_{KKAA}, y SrtA) en tampón de columna. Después del lavado, se cargaron en la columna 200 µg de IgG humano (Sigma). Las muestras de proteínas se recogieron de los lavados y eluciones y se sometieron a electroforesis en gel SDS-PAGE, seguido de tinción con azul Coomassie. Las proteínas purificadas (SpA, SpA_{KKAA}, SpA-D y SpA-D_{KKAA}) fueron recubiertas en placas de ELISA MaxiSorp (NUNC) en 0,1M de tampón de carbonato (pH 9,5) a una concentración de 1 µg ml⁻¹ durante toda la noche a 4°C. Las placas se bloquearon a continuación con 5% de leche entera mediante incubación con diluciones en serie de fragmentos de IgG conjugada con peroxidasa, Fc o F(ab)₂ durante una hora. Las placas se lavaron y se desarrollaron utilizando reactivos de ELISA OptEIA (BD). Las reacciones se extinguieron con 1 M de ácido fosfórico y se utilizaron lecturas de A450 para calcular el título máximo medio y el porcentaje de unión.

Ensayos de unión al factor de von Willebrand (vWF). Las proteínas purificadas (SpA, SpA_{KKAA}, SpA D y SpA-D_{KKAA}) fueron recubiertas y bloqueadas tal como se describe anteriormente. Las placas se incubaron con vWF humano a una concentración de 1 µg ml⁻¹ durante dos horas, a continuación se lavaron y se bloquearon con IgG humano durante otra hora. Después del lavado, las placas se incubaron con dilución en serie de anticuerpos conjugados con peroxidasa dirigida contra el vWF durante una hora. Las placas se lavaron y se desarrollaron utilizando reactivos de ELISA OptEIA (BD). Las reacciones se extinguieron con 1 M de ácido fosfórico y se utilizaron lecturas de A450 para calcular el porcentaje de unión y de título máximo medio. Para los ensayos de inhibición, las placas se incubaron con fragmentos de F(ab)₂ purificados, específicos para SpA-D_{KKAA} a una concentración de 10 mg ml⁻¹ durante una hora antes de los ensayos de unión al ligando.

Apoptosis de esplenocitos. Se inyectaron proteínas purificadas por afinidad (150 µg de SpA, SpA-D, SpA_{KKAA}, y SpA-D_{KKAA}) en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c (de 6 semanas de vida, hembras, Charles River Laboratories). Durante cuatro después de la inyección, se sacrificaron los animales mediante inhalación de CO₂. Sus bazo se extrajeron y se homogeneizaron. Se eliminaron detritus de células utilizando un tamiz celular y las células suspendidas se transfirieron a un tampón de lisis de ACK (0,15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA) par lisar glóbulos rojos. Se sedimentaron glóbulos blancos mediante centrifugación, se suspendieron en PBS y se colorearon con anticuerpo monoclonal anti-CD19 conjugado con R-PE diluido en una relación 1:250 (Invitrogen), y se dejó en hielo y en la oscuridad durante una hora. Las células se lavaron con FBS al 1% y se fijaron con formalina al 4% durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se diluyeron en PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. El órgano restante se examinó para su histopatología. Brevemente, se fijaron los bazo en formalina al 10% durante 24 horas a temperatura ambiente. Los tejidos fueron incluidos en parafina, preparados en secciones finas, y coloreados con el kit de detección de apoptosis (Millipore), y se inspeccionaron mediante microscopía óptica.

Cuantificación de anticuerpos. Se recogieron los sueros de voluntarios humanos o de ratones BALB/c que habían sido infectados con el *S. aureus* Newman o USA300 durante 30 días, o que habían sido inmunizados con SpA-D_{KKAA}/ SpA_{KKAA} tal como se ha descrito anteriormente. Se transfirió la IgG humana/de ratón (Jackson Immunology Laboratory), SpA_{KKAA}, y CRM197 en membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con 5% de leche entera, seguido de la incubación bien con sueros humanos o de ratón. Se utilizó IgG anti-humana/de ratón purificada por afinidad conjugada con IRDye 700DX (Rockland) para cuantificar las intensidades de la señal utilizando el sistema de toma de imágenes de infrarrojos Odyssey™ (Li-cor). Los experimentos con sangre de voluntarios humanos implicaron protocolos que fueron revisados, aprobados y realizados bajo supervisión reguladora del Consejo de evaluación institucional de la Universidad de Chicago (IRB).

Análisis estadístico. Se realizó una prueba t de Student bilateral para analizar la significancia estadística de los abscesos renales, ELISA, y datos de superantígeno de linfocitos B. Los datos de supervivencia animal con el test log-rango (Prism).

Ejemplo 3

Las coagulasas de *Staphylococcus aureus* contribuyen a la formación de abscesos y funcionan como antígenos protectores

Todos los aislados clínicos de *S. aureus* muestran actividad de coagulasa – la coagulación de la sangre o plasma a través de la activación no proteolítica de la protrombina para cortar el fibrinógeno. Los inventores identificaron la protrombina, fibrinógeno, coagulasa (Coa) y la proteína de unión al factor de von Willebrand (vWbp) en lesiones de abscesos estafilocócicos de ratones infectados. Tanto la Coa como el vWbp secretados contribuyeron a la actividad de la coagulasa de *S. aureus* Newman, permitiendo de ese modo la formación de abscesos, además de enfermedad mortal en ratones. Los anticuerpos generados contra la Coa y vWbp purificados bloquean específicamente la asociación del polipéptido correspondiente con protrombina y fibrinógeno. Los anticuerpos específicos Coa- y vWbp-specific, ya sean generados por inmunización activa o pasiva, previnieron la formación de abscesos y la mortalidad de ratones infectados con estafilococos.

VIII. Resultados

Localización de coagulasa y factores de coagulación en abscesos estafilocócicos. Los trabajos previos establecieron el modelo de abscesos renales en ratón, por lo que 1X10⁷ CPU del aislado clínico humano *S. aureus* Newman (Baba *et al.*, 2007) se inyectan en el torrente sanguíneo de ratones BALB/c (Albus *et al.*, 1991). Cuarenta y ocho horas después de la infección, los ratones desarrollaron abscesos diseminados en múltiples órganos, detectables mediante microscopía óptica de tejido renal coloreado con hematoxilina-eosina, preparado en secciones finas inicialmente como una acumulación de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) con pocas bacterias (Cheng *et al.*, 2009). En el día 5 de la infección, los abscesos aumentan en tamaño y encierran una población central de estafilococos (comunidad de abscesos estafilocócicos - SAC), rodeados por una capa eosinofílica, de material amorfo (la pseudocápsula) y una gran masa de PMNs (Cheng *et al.*, 2009). La histopatología revela una necrosis masiva de PMNs en la proximidad del nido estafilocócico en el centro de las lesiones de abscesos además de un manto de fagocitos saludables. En intervalos de tiempo posteriores, las SACs aumentan y los abscesos se rompen, liberando material necrótico y estafilococos en el torrente sanguíneo. Una nueva ronda de formación de abscesos se inicia, precipitando finalmente un resultado letal de las infecciones (Cheng *et al.*, 2009).

Para localizar coagulasas en lesiones de abscesos, los riñones de ratones que habían sido infectados durante 5 días con *S. aureus* Newman se prepararon en secciones finas y se colorearon mediante inmuno-histoquímica con anticuerpos de conejo específicos de Coa- o vWbp- purificados por afinidad (FIG. 10). Los inventores observaron una tinción de Coa intensa en la pseudocápsula que rodea las SACs y en la periferia de las lesiones de abscesos, es decir, la cápsula de fibrina que bordea el tejido no infectado. La tinción de vWbp tuvo lugar a través de las lesiones de abscesos, pero también con acumulación en la periferia. Los anticuerpos específicos de protrombina revelaron tinción del zimógeno en la pseudocápsula y en la periferia, mientras que la tinción específica de

fibrinógeno/fibrina tuvo lugar por todas las lesiones de abscesos. Estos datos en conjunto indican que la pseudocápsula eosinofílica de los abscesos estafilocócicos alberga protrombina y fibrinógeno, que se localizan junto con Coa. En la periferia de las lesiones de abscesos, Coa, vWbp, protrombina y fibrinógeno/fibrina están co-localizadas. Estas observaciones dieron lugar a una investigación en cuanto a si Coa y vWbp son contribuidores cruciales para el establecimiento de abscesos desencadenando la conversión mediada por protrombina de fibrinógeno a fibrina.

La coa y vWbp del *Staphylococcus aureus* contribuyen a la coagulación de la sangre de ratón. Los genes de coa y/o vWbp en el cromosoma de *S. aureus* Newman fueron eliminados mediante reemplazo alélico utilizando la tecnología pKOR1 (Bae y Schneewind, 2005). Dos plásmidos complementarios, *pcoa* y *pvWbp*, se generaron por clonación de los genes estructurales de coa o vWbp además de sus secuencias promotoras aguas arriba en pOS1 (Schneewind *et al.*, 1993). Los plásmidos fueron electroporados en estafilococos y se seleccionó su replicación continuada se seleccionó en medios complementado con cloramfenicol (Schneewind *et al.*, 1992). Cuando se hibridaron para determinar coagulasas con anticuerpos específicos, los inventores observaron la secreción de Coa por parte del tipo silvestre además de la cepa $\Delta vWbp$, pero no por variantes de Δcoa o $\Delta coa/\Delta vWbp$ (FIG. 11). El defecto fenotípico de los mutantes de Δcoa y $\Delta coa/\Delta vWbp$ fue restaurado por electroporación con *pcoa* pero no por *pvWbp* (FIG. 11). De forma similar, se observó la secreción de vWbp en *S. aureus* Newman (tipo silvestre) además de clutivos de mutantes Δcoa , pero no en variantes de $\Delta vWbp$ o $\Delta coa/\Delta vWbp$ variants (FIG. 11). Este defecto se restauró mediante electroporación con *pvWbp*, pero no por *pcoa*.

La coagulación de la sangre es inhibida de forma efectiva por hirudina (lepirudina) (Harvey *et al.*, 1986), un péptido de 65 residuos de sanguijuela que forma un complejo en una relación 1:1 con la trombina, bloqueando de ese modo la conversión proteolítica de fibrinógeno a fibrina (Markwardt, 1955). La inoculación de sangre de ratón tratada con lepirudina con *S. aureus* Newman desencadenó la coagulación en menos de 12 horas, mientras que la sangre infectada con células mock permaneció sin coágulos durante más de 48 horas (FIG. 11C). Utilizando este ensayo se observó que las variantes estafilocócicas que carecen de coagulasa mostraron retrasos en el tiempo de coagulación, Δcoa 36 horas y $\Delta vWbp$ 24 horas (FIG. 11C). El mutante doble, $\Delta coa/\Delta vWbp$, no fue capaz de coagular la sangre de ratón. Estos defectos se complementaron mediante electroporación con plásmidos *pvWbp* además de *pcoa*. Tomados en conjunto, estos datos indican que las dos coagulasas, Coa y vWbp, contribuyen a la capacidad del *S. aureus* Newman para coagular la sangre de ratón (FIG. 11C).

Coa y vWbp son necesarias para la supervivencia estafilocócica en sangre, la formación de abscesos y la bacteriemia letal en ratones. Para analizar las contribuciones de virulencia de las coagulasas, los inventores examinaron en primer lugar la supervivencia estafilocócica en sangre tratada con lepirudina. La cepa de tipo silvestre de *S. aureus* Newman no fue eliminada en la sangre de ratón, sin embargo cada una de las variantes isogénicas que carecían de Coa, es decir, Δcoa y $\Delta coa/\Delta vWbp$, mostró una reducción significativa en las UFC después de 30 min de incubación. Este defecto en la supervivencia fue restituido por *pcoa*, pero no por *pvWbp*, lo que sugiere que únicamente se requiere Coa para la supervivencia estafilocócica en sangre de ratón.

La bacteriemia estafilocócica es una causa frecuente de mortalidad en humanos en entornos hospitalarios (Klevens *et al.*, 2007). Los inventores buscaban determinar si las coagulasas se requieren para una prueba de provocación letal de ratones BALB/c a continuación de inyección intravenosa de 1×10^8 UFC de *S. aureus* Newman. Todos los animales infectados con la cepa Newman parental de tipo silvestre sucumbió a la infección en 24 horas (FIG. 12B). Cada uno de los animales infectados con mutantes únicos, Δcoa o $\Delta vWbp$, mostró un retraso corto pero estadísticamente significativo en el tiempo hasta la muerte (FIG. 12B). La cepa doble mutante resultó significativamente más afectada que los mutantes con delecciones únicas, y los animales infectados con la cepa $\Delta coa/\Delta vWbp$ mostraron la mayor reducción en la virulencia en comparación con el tipo silvestre (FIG. 12B).

Los inventores analizaron a continuación la formación de abscesos en los tejidos renales de ratones infectados y observaron que las variantes de Δcoa resultaron dañadas en su capacidad para formar abscesos en el día 5 y 15 de la infección (Tabla 7, FIG. 12G, 12I)). El mutante $\Delta vWbp$ continuó formando abscesos, aunque la carga bacteriana, el tamaño general de las comunidades de abscesos estafilocócicos y la cantidad de infiltrados inmunes se redujeron en estas variantes (Tabla 7, FIG. 12D, 12F)). Los mutantes en coagulasa están ligeramente más atenuados en virulencia que los de vWbp, ya que Δcoa presenta menor formación de abscesos y carga bacteriana en el día 15. Sin embargo, los mutantes dobles $\Delta coa / \Delta vWbp$ se vieron notablemente mermados en su capacidad para formar abscesos y persistieron en tejidos infectados (Tabla 7, FIG. 12H, 12K)). Por tanto, la proteína de unión tanto a coagulasa como al factor de von Willebrand es importante para la supervivencia estafilocócica en el huésped, ya sea en el torrente sanguíneo o en tejidos de órganos extremos.

Tabla 7. Virulencia de mutantes de *S. aureus* Newman *coa*, *vWbp*, y *coa/vWbp*

Cepa	Carga estafilocócica en tejido renal*			Formación de abscesos en tejido renal*		
	^a log ₁₀ UFC g ⁻¹ de tejido renal	^b Significancia valor P	^c Reducción (log ₁₀ UFC g ⁻¹)	^e Abscesos de superficie (%)	^e Número de abscesos por riñón	^b Significancia Valor P
Análisis en el día 5 de la carga estafilocócica y formación de abscesos						
PBS	6,034 ± 0,899	-	-	75	2,333 ± 0,623	-
<i>Coa</i>	5,538 ± 0,560	0,3750	0,492	38	1,111 ± 0,389	0,1635
<i>vWbp</i>	5,247 ± 0,311	0,0859	0,783	56	1,750 ± 0,650	0,6085
<i>Coa/vWbp</i>	4,908 ± 0,251	0,0044	1,395	25	0,750 ± 0,342	0,0786
Análisis en el día 15 de la carga estafilocócica y formación de abscesos						
PBS	5,380 ± 0,294	-	-	81	3,000 ± 1,234	-
<i>Coa</i>	4,023 ± 0,324	0,0077	1,357	44	1,400 ± 0,452	0,1862
<i>vWbp</i>	5,140 ± 0,689	0,0688	0,240	50	1,625 ± 0,298	0,2974
<i>Coa/vWbp</i>	3,300 ± 0,552	0,0056	2,080	20	0,556 ± 0,154	0,0341

*Se inyectó a cada uno de unos ratones BALB/c (n=18-20) en el peritoneo 100 µl de anticuerpos de conejo purificados por afinidad contra *vWbp* (α-*vWbp*), *Coa* (α-*Coa*) o *vWbp* y *Coa* (α-*vWbp/Coa*) en el día 0. Veinticuatro horas después, los animales fueron examinados para determinar los títulos de anticuerpos de IgG en suero y se sometieron a una prueba de provocación mediante inoculación intravenosa con 1X10⁷ unidades formadoras de colonia (UFC) de *S. aureus* Newman o mutantes del mismo. Cinco o quince días después, los animales fueron sacrificados y ambos riñones extraídos. Un riñón se fijó en formaldehído, se incluyó en parafina, se preparó en secciones finas, se coloreó con hemaotoxilina-eosina y se analizaron cuatro secciones sagitales por riñón para formación de abscesos. El otro riñón fue homogeneizado en tampón de PBS, el homogeneizado se extendió sobre medio con agar para formación de colonias, y se enumeró la carga estafilocócica como UFC.

^aMedias de la carga estafilocócica calculada como log₁₀ UFC g⁻¹ en tejidos renales homogeneizados 4 días a continuación de la infección en cohortes de dieciocho a veinte ratones BALB/c por inmunización. Se indica el error estándar de la media (±SEM).

^bSe calculó la significancia estadística con la prueba *t* de Student bilateral y desapareada y los valores P se registraron; los valores P <0,05 se consideraron significativos.

^cReducción en la carga bacteriana calculada como log₁₀ UFC g⁻¹.

^eLa formación de abscesos en los tejidos renales cuatro días después de la infección se midió mediante inspección macroscópica (% positivo).

^fHistopatología de riñones de diez animales en secciones finas y con tinción de hematoxileno-eosina; se registró la cantidad de abscesos media por riñón y se calculó la media nuevamente para la media final (±SEM).

^gSe calculó la significancia estadística con la prueba *t* de Student bilateral y desapareada y los valores P se registraron; los valores P <0,05 se consideraron significativos.

Anticuerpos contra las coagulasas y su efecto en la coagulación sanguínea inducida durante la infección estafilocócica. His₆-*Coa* y His₆-*vWbp* recombinantes fueron purificadas por cromatografía de afinidad sobre Ni-NTA (FIG. 13A), se emulsionaron en adyuvante y se inyectaron en conejos para generar anticuerpos específicos que se purificaron en matrices de afinidad que albergaban la proteína recombinante. Los anticuerpos dirigidos contra *Coa* se unieron preferentemente a *Coa*, no a *vWbp* (FIG. 13B). También ocurría lo recíproco para los anticuerpos dirigidos contra *vWbp* (FIG. 13B). Cuando se añadió a la sangre de ratón tratada con lepirudina infectada con *S. aureus* Newman, los inventores observaron que cada uno de los anticuerpos dirigidos contra *Coa*, *vWbp* o *Coa* y *vWbp* bloqueaba la coagulación de la sangre (FIG. 13C). Como controles, las muestra tratadas con mock o el anticuerpo V10 irrelevante (que proporciona protección contra la inyección de *Yersinia pestis* tipo III (DeBord *et al.*, 2006)) no tuvo ningún efecto (FIG. 13C).

Para examinar el papel de los anticuerpos en *Coa* o *vWbp* aislados, los inventores purificaron proteínas recombinantes funcionalmente activas (Friedrich *et al.*, 2003) que fueron añadidas a sangre de ratón tratada con

lepirudina. La sangre de ratón tratada con Coa o vWbp coaguló en menos de 30 minutos (FIG. 13D). Como control, las células mock (PBS) o el tratamiento con anticuerpo V10 irrelevante no afectó a la coagulación. Los anticuerpos dirigidos contra Coa o vWbp retrasaron la coagulación de la sangre de ratón tratada con proteínas recombinantes y esto ocurrió incluso para el factor homólogo de reacción cruzada (FIG. 13D). La reactividad mínima de los anticuerpos se observó mediante ELISA y western blot, aunque hay inhibición cruzada de la función.

Anticuerpos que bloquean la asociación entre las coagulasas y la protrombina o fibrinógeno. Se utilizó resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés) para investigar cómo los anticuerpos α Coa y α vWbp interfieren con las funciones de las coagulasas. La protrombina se inmovilizó en un chip CM5. Haciendo fluir Coa purificada sobre la muestra, se calculó una constante de disociación de KD 28 nM, una medición que corresponde con otros informes en la literatura (Friedrich *et al.*, 2003). La adición de α Coa condujo a una disminución dependiente de la concentración en señal de respuesta para la formación de protrombina-Coa, indicando que estos anticuerpos bloquean la asociación de Coa con la protrombina (FIG. 14A). La SPR confirmó además la asociación entre la coagulasa y fibrinógeno (KD 93,1 nM, FIG. 14B). Tras la pre-incubación con α Coa, los inventores observaron una disminución drástica en la unión de Coa a fibrinógeno (FIG. 14B). Tomados en conjunto, estos resultados indican que los anticuerpos dirigidos contra Coa bloquean la asociación de esta molécula con los factores de coagulación de la sangre.

vWbp purificada mostró una fuerte afinidad por la protrombina (KD 38,4 nM, FIG. 13C) y el fibrinógeno (484 nM, FIG. 13D), la última de las cuales no había sido apreciada hasta ahora (Kroh *et al.*, 2009). Además, la pre-incubación con anticuerpos generados contra vWbp bloqueó la asociación entre vWbp y protrombina o fibrinógeno de forma dependiente a la dosis (FIG. 13C, 13D). Estas observaciones confirman los resultados de los ensayos de coagulación, que demuestran que los anticuerpos policlonales específicos pueden bloquear la interacción entre Coa o vWbp y los componentes específicos de la cascada de coagulación (FIG. 12).

Para analizar si los anticuerpos específicos para coagulasas bloquean la conversión de fibrinógeno a fibrina, se midió la capacidad de los complejos protrombina•coagulasa para cortar el S-2238, un análogo para el corte de fibrinógeno a fibrina (FIG. 14E, 14F). La adición de anticuerpos específicos a protrombina•Coa o protrombina•vWbp redujo la capacidad de estos complejos para convertir el sustrato a producto. Además, se observó inhibición cruzada de los anticuerpos específicos de coagulasa, donde la adición de anticuerpos de reacción cruzada causó una reducción en la actividad del complejo protrombina•vWbp. Estos datos sugieren que los anticuerpos específicos dirigidos contra Coa o vWbp neutralizan el efecto patofisiológico del producto secretado al que se unen.

Los anticuerpos contra coagulasas proporcionan protección contra la enfermedad estafilocócica. Anticuerpos de tipo IgG específicos para Coa o vWbp se aislaron a partir de suero de conejo mediante cromatografía sobre columna de afinidad, generada por el entrecruzamiento covalente del antígeno a sefarsa CNBr. Los inventores intentaron alterar la patogénesis mediante la administración de anticuerpos neutralizantes, dirigidos contra Coa y/o vWbp. Se administró a los ratones anticuerpos de conejo y se sometieron a prueba de provocación con una dosis letal de la cepa Newman de *S. aureus*. La inyección de anticuerpos específicos de Coa o vWbp prolongó la supervivencia murina (FIG. 15).

Para analizar los reactivos de anticuerpos para posible protección con vacuna contra la bacteriemia letal, se inyectó IgG purificado por afinidad (5 mg kg⁻¹ de peso corporal) en la cavidad peritoneal de los ratones. Veinticuatro horas después, se inyectó a los animales una suspensión de 1 X 10⁸ UFC de *S. aureus* Newman en PBS en el plexo retroorbital. Al monitorizar a los animales en el tiempo, los inventores observaron que los anticuerpos dirigidos contra vWbp (α vWbp) conducían a un aumento del tiempo hasta la muerte y a un 10% de supervivencia, en comparación con animales que habían recibido los anticuerpos α V10 irrelevantes y murieron dentro de un periodo de 12-48 horas (FIG. 15). Los anticuerpos contra Coa (α Coa) además aumentaron el tiempo hasta la muerte de los ratones con inmunización pasiva (FIG. 15). Una mezcla de ambos anticuerpos (α Coa/ α vWbp) no generaron una mejora estadísticamente significativa en la supervivencia o tiempo hasta la muerte sobre los anticuerpos de α Coa.

Para examinar la inmunización pasiva para la protección contra la formación de abscesos estafilocócicos, se inyectaron anticuerpos purificados (5 mg kg⁻¹ de peso corporal) en la cavidad peritoneal de los ratones y se monitorizó la formación de abscesos durante cinco días después de la prueba de provocación intravenosa con 1 X 10⁷ UFC de *S. aureus* Newman. Los anticuerpos contra vWbp no condujeron a una reducción significativa en la carga estafilocócica o en el número de lesiones inflamatorias (Tabla 8), aunque las lesiones observadas albergaban comunidades de abscesos más pequeñas e infiltrados PMN reducidos en comparación con ratones inmunizados con mock (FIG. 16). Los anticuerpos contra la coagulasa redujeron la carga estafilocócica (P=0,042) además del número de lesiones inflamatorias (P=0,039); no se detectaron lesiones de abscesos con comunidades estafilocócicas en el nido de grandes infiltrados de PMN (FIG. 16 y Tabla 8). Los animales que recibieron ambos anticuerpos, α vWbp y α Coa, mostraron una reducción incluso mayor en la carga estafilocócica (P=0,013) y una reducción en la abundancia de lesiones inflamatorias (P=0,0078) (Tabla 8). En conjunto, estos datos indican que los anticuerpos contra las coagulasas, administrados mediante inmunización pasiva, protegen a los ratones contra la formación de abscesos y permiten el aclaramiento del patógeno invasor de los tejidos del huésped. Los anticuerpos contra vWbp contribuyen relativamente poco a la protección de la vacuna, en concordancia con el descubrimiento de que vWbp

nmo juega el mismo papel de vital importancia que Coa durante la patogénesis de las infecciones por *S. aureus* en ratones (Tabla 8).

Tabla 8. Inmunización pasiva de ratones con anticuerpos de conejo contra Coa y/o vWbp

Carga estafilocócica en tejido renal*				Formación de abscesos en tejido renal*			
Anticuerpo de conejo purificado	^a log ₁₀ UFC g ⁻¹ de tejido de riñón	^b Significancia (Valor P)	^c Reducción n en log ₁₀ UFC g ⁻¹	^d Título de IgG	^e Abscesos de superficie (%)	^f Número de abscesos	^g Significancia Valor P
Mock	5,86 ± 0,29	-	-	<100	75	4,6 ± 1,4	-
α- vWbp	5,25 ± 0,36	0,3554	1,60	1,100 ± 200	39	1,4 ± 0,5	0,0592
α-Coa	4,68 ± 0,47	0,0420	1,18	1,300 ± 250	20	1,2 ± 0,7	0,0396
α- vWbp/Coa	0,52 ± 4,29	0,0130	1,53	1,000 ± 300	25	0,3 ± 0,2	0,0078

*Se inyectó a cada uno de los ratones BALB/c (n=18-20) en el peritoneo 100 µl de anticuerpos de conejo purificados por afinidad contra vWbp (α-vWbp), Coa (α-Coa) o vWbp y Coa (α-vWbp/Coa) en el día 0. Veinticuatro horas después, los animales fueron examinados para determinar los títulos de anticuerpos de IgG en suero y se sometieron a una prueba de provocación mediante inoculación intravenosa con 1X10⁷ unidades formadoras de colonia (UFC) de *S. aureus* Newman. Cinco días después, los animales fueron sacrificados y ambos riñones extraídos. Un riñón se fijó en formaldehído, se incluyó en parafina, se preparó en secciones finas, se coloreó con hemaotxilina-eosina y se analizaron cuatro secciones sagitales por riñón para formación de abscesos.

El otro riñón fue homogeneizado en tampón de PBS, el homogeneizado se extendió sobre medio con agar para formación de colonias, y se enumeró la carga estafilocócica como UFC.

^aMedias de la carga estafilocócica calculada como log₁₀ UFC g⁻¹ en tejidos renales homogeneizados 4 días a continuación de la infección en cohortes de dieciocho a veinte ratones BALB/c por inmunización. Se indica el error estándar de la media (±SEM).

^bSe calculó la significancia estadística con la prueba *t* de Student bilateral y desapareada y los valores P se registraron; los valores P <0,05 se consideraron significativos.

^cReducción en la carga bacteriana calculada como log₁₀ UFC g⁻¹.

^eLa formación de abscesos en los tejidos renales cuatro días después de la infección se midió mediante inspección macroscópica (% positivo).

^fHistopatología de riñones de diez animales en secciones finas y con tinción de hematoxileno-eosina; se registró la cantidad de abscesos media por riñón y se calculó la media nuevamente para la media final (±SEM).

^gSe calculó la significancia estadística con la prueba *t* de Student bilateral y desapareada y los valores P se registraron; los valores P <0,05 se consideraron significativos.

- 5 **Las coagulinas funcionan como antígenos protectores para las infecciones estafilocócicas.** CoA y vWbp marcadas con poli-histidina se purificaron a partir de *E. coli* y se utilizaron como antígeno de vacunas subunitarias. Las proteínas (100 µg emulsionadas en CFA o IFA) fueron inyectadas en ratones naive BALB/cen el día 0 (CFA) or 11 (IFA). Los animales se sometieron a prueba de provocación en el día 21 mediante inoculación intravenosa del *S. aureus* Newman. Se desangraron cinco animales a la hora de la prueba de provocación, y se determinaron los
- 10 títulos de anticuerpos contra antígenos de vacuna mediante ELISA (Tabla 9). Los animales se sacrificaron cinco o quince días a continuación de la prueba de provocación estafilocócica y se analizó la histopatología de las lesiones de abscesos. La inmunización con Coa redujo la carga bacteriana en el día (P=0,03, PBS mock vs. Coa) y día 15 (P=4,286 X 10⁻⁵, PBS mock vs. Coa, ver Tabla 9). La vacunación con Coa también disminuyó el número de lesiones infecciosas que se formó en los tejidos renales, mock vs. Coa, P=0,03 (día 5) y P=0,0522 (día 15) (Tabla 9). Ha de
- 15 destacarse que ninguno de los ratones inmunizados con Coa desarrolló lesiones de abscesos típicas (FIG. 17). En ocasiones se observaron pequeñas acumulaciones de PMNs que no estaban asociados con comunidades de abscesos estafilocócicas (FIG. 17). La inmunización con vWbp no redujo de forma significativa la carga estafilocócica en el día 5 (P=0,39, PBS mock vs. vWbp) o en el día 15 (P=0,09, PBS mock vs. vWbp). El número total de lesiones inflamatorias no se redujo. Sin embargo, la arquitectura de los abscesos había cambiado después
- 20 de la inmunización con vWbp. No se detectaron comunidades en el centro de los abscesos y en su lugar se observaron infiltraciones de PMN (FIG. 17). La vacuna de combinación, vWbp-Coa, además redujo el número de células inflamatorias en los tejidos renales y los animales infectados no mostraron lesiones de abscesos en el día 5 o 15 (Tabla 9).

Tabla 9. Inmunización activa de ratones con Coa y/o vWbp

Antígeno de vacuna Purificado	Carga estafilocócica en tejido renal*			Formación de abscesos en tejido renal*			
	^a log ₁₀ UFC g ⁻¹ de tejido renal	^b Significancia (Valor P)	^c Reducción en log ₁₀ UFC g ⁻¹	^d Título de IgG	^e Abscesos de superficie (%)	^f Número de abscesos por riñón	^g Significancia (Valor P)
Día 5	Mock	—	—	<100	56	1.3 ± 0.3	—
	vWbp	0.1413	0.81	14,000 ± 5,000	45	1.8 ± 0.5	0.39
	Coa	0.1417	0.88	19,000 ± 4,000	25	0.3 ± 0.3	0.03
	vWbp/Coa	0.1195	0.90	7,000 ± 1,500	25	0.3 ± 0.3	0.03
Día 15	Mock	—	—	<100	75	6.0 ± 1.9	—
	vWbp	0.4503	3.27	14,000 ± 5,000	20	1.8 ± 1.1	0.09
	Coa	0.1681	3.25	19,000 ± 4,000	20	1.2 ± 0.8	0.05
	vWbp/Coa	0.0263	2.89	7,000 ± 1,500	30	0.7 ± 0.5	0.01

*Se inyectó a cada uno de los ratones BALB/c (n=18-20) en el peritoneo 100 µg de vWbp, Coa o vWbp y Coa emulsionado en CFA en el día 0 y reforzado con el mismo antígeno emulsionado con IFA en el día 11. En el día 20, los animales fueron examinados para determinar los títulos de anticuerpos de IgG y en el día 21 los animales se sometieron a una prueba de provocación mediante inoculación intravenosa con 1X10⁷ unidades formadoras de colonia (UFC) de *S. aureus* Newman. En el día 25, los animales fueron sacrificados y ambos riñones extraídos. Un riñón se fijó en formaldehído, se incluyó en parafina, se preparó en secciones finas, se coloreó con hematoxilina-eosina y se analizaron cuatro secciones sagitales por riñón para formación de abscesos. El otro riñón fue homogeneizado en tampón de PBS, el homogeneizado se extendió sobre medio con agar para formación de colonias, y se enumeró la carga estafilocócica como UFC.

^aMedias de la carga estafilocócica calculada como log₁₀ UFC g⁻¹ en tejidos renales homogeneizados 4 días a continuación de la infección en cohortes de dieciocho a veinte ratones BALB/c por inmunización. Se indica el error estándar de la media (±SEM).

^bSe calculó la significancia estadística con la prueba t de Student bilateral y desapareada y los valores P se registraron; los valores P <0.05 se consideraron significativos.

^cReducción en la carga bacteriana calculada como log₁₀ UFC g⁻¹.

^dLas medias de cinco títulos de IgG en suero elegidos aleatoriamente se midieron previamente a la infección estafilocócica mediante ELISA con el antígeno SpA-DKKAA.

^eLa formación de abscesos en los tejidos renales cuatro días después de la infección se midió mediante inspección macroscópica (% positivo).

^fHistopatología de riñones de diez animales en secciones finas y con tinción de hematoxilina-eosina; se registró la cantidad de abscesos media por riñón y se calculó la media nuevamente para la media final (±SEM).

^gSe calculó la significancia estadística con la prueba t de Student bilateral y desapareada y los valores P se registraron; los valores P <0.05 se consideraron significativos.

^hAnálisis de ratones 5 días a continuación de la infección con *S. aureus* Newman.

ⁱAnálisis de ratones 15 días a continuación de la infección con *S. aureus* Newman.

IX Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y cultivos de crecimiento. Se cultivaron estafilococos en agar con soja triptica o caldo a 37°C. Las cepas de *E. coli* DH5α y BL21(DE3) (Studier *et al.*, 1990) en agar o caldo a 37°C. Se utilizó ampicilina (100 µg/ml) y cloramfenicol (10 mg/ml) se utilizaron para la selección de plásmido, respectivamente pET15b (Studier *et al.*, 1990) y pOS1 (Schneewind *et al.*, 1993).

Generación de mutantes. Se amplificaron secuencias de ADN sequences de 1 kb aguas arriba y aguas abajo de coa y vWbp por PCR utilizando los cebadores attB1_Coa, Coa1_BamHI, Coa2_BamHI, attB2_Coa y attB1_vWF, vWF1_BamHI, vWF2_BamHI, attB2_vWF (Tabla 10). Los fragmentos se intercambiaron en pKOR1 utilizando el kit BP clonasa II (Invitrogen) (Bae y Schneewind, 2005). Estos vectores fueron electroporados en *S. aureus* Newman y sometidos a desplazamiento de temperatura inducida por el intercambio alélico para generar la correspondiente delección (Bae y Schneewind, 2005). Los mutantes fueron verificados mediante amplificación por PCR del locu génico, secuenciamiento de ADN, y análisis por inmunoblot.

Para generar plásmidos de complementación, los cebadores Coa_promotor_BamHI_F, Coa_out_PstI_R, vWbp_promotor_BamHI_F, vWbp_out_PstI_R (Tabla 10) se diseñaron para incluir la región promotora aguas arriba de vWbp o coa y las regiones amplificadas se clonaron en pOS1. Estos plásmidos se verificaron mediante secuenciación y a continuación fueron electroporados en cepas estafilocócicas. Para análisis de inmunoblot, se refrescaron los cultivos de toda la noche de estafilococos cultivados en caldo de soja triptica (Difco), en una relación 1:100 y se cultivaron con agitación a 37°C hasta que alcanzaron OD₆₀₀ de 0,4. Muestras de un ml de cada cultivo se centrifugó a 13.000 xg durante 10 min en una centrifugadora de sobremesa y el sobrenadante se recuperó. Se añadió ácido tricloroacético, 75 µl de una solución al 100% peso/volumen, y las muestras fueron incubadas en hielo durante 10 min, seguido de centrifugación y lavado con 1 ml de acetona helada al 100%. Las muestras se secaron con aire durante la noche y se solubilizaron en 50 µl de tampón de muestra (4% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH8, 10% glicerol, y azul bromofenol).

Ensayo de supervivencia en sangre y coagulación de la sangre. Los cultivos de toda la noche se cepas estafilocócicas se diluyeron en una relación 1:100 en TSB fresco y se cultivaron a 37°C hasta que lograron un OD₆₀₀ 0,4. Un ml de cultivo se centrifugó, y los estafilococos se lavaron y suspendieron en 10 ml de PBS estéril para generar una suspensión de 1X10⁷ UFC/ml. Se recogió sangre entera de ratones Balb/c naive de 6 semanas y se añadió REFLUDAN™ (lepirudina, Bayer) a una concentración final de 50 µg/ml. 450 µL de sangre se alícuota en un tubo de eppendorf de 1 ml y se mezcló con una muestra bacteriana de 50 µl (1x10⁵ UFC/ml). Las muestras se incubaron a 37°C con rotación lenta. Se extrajeron 100 µl de alícuotas en tiempos de 0 min y 30 min, mezclados en una relación de 1:1 with 2% saponina/PBS y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se prepararon cinco diluciones en serie en una relación 1:10 y se extendieron 10 µl de alícuotas sobre agar TSA para la formación y enumeración de colonias.

Para evaluar la actividad de coagulación de la sangre bacteriana, se añadió 10 µl del cultivo madre bacteriano anterior a 100 µl de sangre de ratón anti-coagulada en un tubo de ensayo de plástico estéril (BD falcon) para lograr una concentración final de 1x10⁵ UFC/ml. Para la alteración de los anticuerpos, se añade a la mezcla una cantidad adicional de 10 µl de PBS que contiene 3x10⁻⁵ Mol de anticuerpo. Para evaluar las proteínas recombinantes, se añadió 10 µl de proteína en tampón de PBS a una concentración final de 50 µM. Los tubos de ensayo se incubaron a temperatura ambiente y se verificó la liquidez o coagulación inclinando los tubos a ángulos de 45° en intervalos de tiempo regulares.

Purificación de proteínas. Para estudios de vacunación, se clonó una secuencia de longitud completa de Coa o vWbp madura en un vector pET15b utilizando los cebadores Coa_directo_XhoI, Coa_inverso_BamHI, vWbp_directo_XhoI, vWbp_inverso_BamHI (Tabla 10) para obtener His₆-Coa y His₆-vWbp. Se cultivó *E. coli* BL21(DE3) conteniendo vectores de expresión a 37°C y fue inducido con 1 mM IPTG después de dos horas. Cuatro horas después de la inducción, las células se centrifugaron a 6.000 X g, se suspendieron en 1 X tampón de columna (0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl) y se lisaron en una prensa French a 14.000 lb/in². Los lisados se sometieron a ultracentrifugación a 40.000 X g durante 30 min y el sobrenadante se sometió a cromatografía Ni-NTA, se alvó con tampón que contenía 25 µM de imidazol, seguido por la elución con 500 µM imidazol. El eluato se dializó con 1 X PBS. Para retirar la endotoxina, se añadió Triton-X114 en una relación 1:1.000 y la solución se enfrió durante 5 min, se incubó a 37°C durante 10 min, y se centrifugó a 13.000 X g. El sobrenadante se cargó en la columna de desalación de HiTrap para eliminar cualquier remanente de Triton-X114.

Tabla 10. Cebadores utilizados en este estudio

Nombre del Cebador	Secuencia
attB1_Coa	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTgatgactaagtgaaaaagaag (SEQ ID NO:46)
Coa1_BamHI	aaGGATCCcctccaaatgtaattgcc (SEQ ID NO:47)
Coa2_BamHI	aaGGATCCgtttgtaactctatccaaagac (SEQ ID NO:48)
attbB2_Coa	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTgacacctattgcacgattcg (SEQ ID NO:49)
attB1_vWF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTcagatagcgattcagattcag (SEQ ID NO:50)
vWF1_BamHI	aaGGATCCctgtattttctccttaattttcc (SEQ ID NO:51)
vWF2_BamHI	aaGGATCCcatggctgcaaagcaaataatg (SEQ ID NO:52)
attbB2_vWF	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTgccctgggtgaacaaattatg (SEQ ID NO:53)
Coa_promoter_BamHI_F	gaaGGATCCgtttattctagttaatatagttatg (SEQ ID NO:54)
Coa_out_PstI_R	gaaCTGCAGctgtatgtctttgtagagttac (SEQ ID NO:55)
vWbp_promoter_BamHI_F	gaaGGATCCggtggctttttacttggttttc (SEQ ID NO:56)
vWbp_out_PstI_R	gaaCTGCAGcgacaaactcattatttgctttgc (SEQ ID NO:57)
Coa_foward_XhoI	GAAGTCGAGTCTAGCTTATTACATGG (SEQ ID NO:58)
Coa_Xho_factorXa_F	GAAGTCGAGatagaaggcagaatagtaacaaaggattatagtg (SEQ ID NO:59)
Coa_reverse_BamHI	GTAAGATCCTGGGATAGAGTTACAAAC (SEQ ID NO:60)
vWbp_forward_XhoI	GAAGTCGAGgcattatgtgtatcacaaatttg (SEQ ID NO:61)

Tabla 10. Cebadores utilizados en este estudio

Nombre del Cebador	Secuencia
vWbp_Xho_factorXa_F	GAAGCTCGAGatagaaggcagagtgggttctggggagaagaatc (SEQ ID NO:62)
vWbp_reverse_BamHI	GAAGCTCGAGgcagccatgcattaattatttggcc (SEQ ID NO:63)

Para estudios enzimáticos, ELISA y SPR, la secuencia de codificación de longitud completa de Coa o vWbp se clonaron en forma de pET15b con los cebadores Coa_Xho_factorXa_F, Coa_inverso_BamHI, vWbp_Xho_factorXa_F, vWbp_inverso_BamHI (Tabla 10) que contiene un sitio de Factor Xa anterior al inicial Ile-Val-Thr-Lys de coagulasa y Val-Val-Ser-Gly de vWbp. Estas proteínas se expresaron y purificaron utilizando el protocolo anterior, a continuación se cortó con 10 unidades de Factor Xa/1ml durante 1 hora a 25°C para eliminar la etiqueta His₆ del extremo N-terminal. Las proteínas se cargaron a continuación en una columna Superdex 75 (GE Healthcare) para la purificación final. Todas las proteínas eluidas se almacenaron en 1X PBS.

Anticuerpos de conejo. La concentración de proteínas se determinó utilizando un kit BCA (Thermo Scientific). La pureza se verificó mediante análisis en SDS PAGE en gel y tinción con azul Coomassie Brillante. Se inmunizaron conejos Nueva Zelanda blancos hembras de seis meses (Charles River Laboratories) con 500 µg de proteína emulsionada en CFA (Difco) para la inmunización inicial o IFA para inmunizaciones de refuerzo en el día 24 y 48. En el día 60, se desangraron los conejos y el suero se recuperó para inmunoblot o experimentos de transferencia pasiva. Para la purificación de anticuerpos, se enlazó de forma covalente la His₆-Coa o His₆-vWbp recombinante (5 mg) a columnas HP de HiTrap activada por NHS (GE Healthcare). Esta matriz antigénica se utilizó a continuación para realizar cromatografía de afinidad de 10-20 ml de suero de conejo a 4°C. La matriz cargada se lavó con 50 volúmenes de columna de PBS, se eluyeron los anticuerpos con un tampón de elución (1 M glicina pH 2,5, 0,5 M NaCl) y se neutralizaron inmediatamente con 1M Tris-HCl, pH 8,5. Los anticuerpos purificados se dializaron durante la noche contra PBS a 4°C.

Resonancia de plasmones superficiales. La afinidad y las tasas de asociación y disociación se midieron en un aparato BIACore 3000. Los tampones se filtraron estériles y se desgasificaron. Se preparó un chip CM5 para ligamiento de amina mediante inyección de protrombina humana (500 nM, pH 4,0) (Innovative Research) y fibrinógeno (200 nM, pH 4,5) (Innovative Research) en presencia de 0,2 M EDC y 0,05 M NHS. Para medir la interacción de la coagulasa con la protrombina y fibrinógeno, se diluyó Coa en tampón HBS-P (20 mM HEPES [pH 7,4], 150 mM NaCl, 0,005% [vol/vol] de tensioactivo P20) en concentraciones de 0 - 75 nM con inyecciones sucesivas de coagulasa durante 300 segundos seguido por 300 segundos para la disociación seguido por la regeneración con NaOH (50 µL, 30 segundos). K_D y χ^2 se determinaron utilizando el software de BiaEvaluation y se determinó el mejor resultado con un modelo de unión en una relación 1:1 con una línea de referencia de acumulación y R_{max} local. La interacción del factor de von willebrand con la protrombina y el fibrinógeno fue medido de la misma manera. Todos los experimentos se repitieron por triplicado. Los experimentos de inhibición con anticuerpos policlonales se realizaron mediante inyecciones consecutivas de coagulasa (25 nM) incubada con α Coa a 0 nM - 200 nM bajo las mismas condiciones de inyección descritas anteriormente. vWF (50 nM) se incubó de manera similar con α vWF a 0 nM - 400 nM. Se midió la diferencia de respuesta como el cambio en las unidades de respuesta desde antes de la inyección hasta el final de la inyección.

Mediciones de la actividad de la coagulasa. Se pre-incubó 1×10^{-16} M de protrombina (Innovative Research) durante 20 min con una cantidad equimolar de coagulasa funcional o vWbp a temperatura ambiente, seguido de la adición de S-2238 (un sustrato cromogénico) hasta una concentración final de 1 mM en un tampón de reacción total de 100 µl 1 X PBS. El cambio en la absorbancia se midió a 450 nm durante 10 minutos en un espectrofotómetro, representado como una función del tiempo y ajustado a una línea curva. La pendiente de la curva (dA/dt) se interpretó como la tasa de la hidrólisis de S-2238, y por tanto un reflejo de la función enzimática (% actividad coagulasa-protrombina o vWbp-protrombina del complejo). El ensayo se repitió en presencia de anticuerpos específicos o transcrsales añadidos en exceso de 3M excess (3×10^{-16} M) y los datos se normalizaron al % de la actividad media sin inhibición.

Modelo de abscesos renales y prueba de provocación letal. Los cultivos de toda la noche de cepas estafilocócicas se diluyeron en una relación 1:100 en TSB fresco y se cultivaron hasta que alcanzaron un OD₆₀₀ de 0,4. Se centrifugaron 10 ml de bacterias a 7.500 xg, se lavaron, y se suspendieron en 10 ml de 1XPBS. Se inyectó por vía retroorbital a ratones BALB/c hembra de seis semanas de vida (Charles River) 1×10^7 de una suspensión estafilocócica de UFC en 100 µl de PBS. Se utilizaron cohortes de 10 ratones. En el quinto día posterior a la infección estos ratones se sacrificaron mediante asfixia por CO₂ y se extirparon sus riñones. Todos los órganos fueron examinados para determinar lesiones de superficie y 8-10 riñones derechos se enviaron para seccionado para histopatología y tinción con hematoxilina-eosina. Estos portaobjetos se examinaron mediante microscopía óptica para determinar abscesos internos. Para el modelo de prueba de provocación letal, todas las condiciones experimentales permanecen igual excepto que 1×10^8 UFC de estafilococos se administraron y que los ratones se monitorizaron durante 10 días después de la infección para la supervivencia.

Tinción Inmunoquímica de secciones renales. Se eliminó la parafina de los riñones seccionados y se rehidrataron mediante xileno y diluciones en serie de EtOH en agua destilada. Se incubaron en el tampón de recuperación del antígeno (DAKO, pH 6,0) y se calentó en un vaporizador a aproximadamente 96°C durante 20 minutos. Después de enjuagar, los portaobjetos se incubaron en 3% de hidrógeno de peróxido durante 5 minutos y a continuación 10% de suero normal en 0,025% Tritonx-100 -PBS durante 30 minutos. Se utilizó 10% de IgG humana como reactivo bloqueante durante 30 minutos de incubación (Sigma-Aldrich). Se aplicó anticuerpo primario en los portaobjetos para una incubación de toda la noche a 4°C grados en una cámara de humedad. Los anticuerpos primarios utilizados fueron 1:500 prtrombina anti-ratón de rata (Innovative Research), 1:500 fibrinógeno de conejo anti-ratón (Innovative Research), 1:250 anti-estafilocoagulasa de conejo, o 1:250 anti-estafilococos de conejo vwbp. Después de lavado con TBS, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo secundario biotinilado (1:50 dilución de IgG de anti-rata biotinilada, BA-4001 de Vector Laboratories; o 1:200 dilución de IgG anti-conejo biotinilado, BA-1000 del Vector), y a continuación los reactivos ABC (Vector Laboratories). La unión antígeno-anticuerpo se detectó mediante sistema cromógeno del sustrato DAB. Los portaobjetos se sumergieron brevemente en hematoxilina para contra-tinción y evaluación bajo microscopía óptica.

Inmunización activa. Se inyectó a cada uno de los ratones BALB/c de tres semanas 50 µg de proteína, se emulsionó en 100 µl de CFA. Se utilizaron cohortes de 15 ratones, con 5 ratones reservados para sangrado y títulos de anticuerpos. Once días después de la vacunación, estos ratones se reforzaron con 50 µg de proteína cada uno, se emulsionó en 100 µl de IFA. En el día 21, se inyectó a los ratones con 1x10⁷ de UFC de estafilococos para el modelo de abscesos renales o 1x10⁸ UFC para la prueba de provocación letal. En el momento de la infección 5 ratones se desangraron para obtener títulos de anticuerpos.

Transferencia pasiva de anticuerpos. Veinticuatro horas antes de la infección, se inyectó a ratones BALB/c de seis semanas de vida anticuerpos purificados contra Coa y/o vWbp en una dosis de 5 mg/kg de peso corporal. Se utilizaron cohortes de 10 ratones. Estos ratones se sometieron a prueba de provocación mediante inyección retroorbital con 1x10⁷ de UFC (modelo de abscesos renales) o 1x10⁸ de UFC de estafilococos (bacteriemia letal).

Referencias

Las siguientes referencias proporcionan ejemplos de procedimientos u otros detalles complementarios para los expuestos en la presente patente.

Patente estadounidense 3,791,932

Patente estadounidense 3,949,064

Patente estadounidense 4,174,384

Patente estadounidense 4,338,298

Patente estadounidense 4,356,170

Patente estadounidense 4,367,110

Patente estadounidense 4,372,945

Patente estadounidense 4,452,901

Patente estadounidense 4,474,757

Patente estadounidense 4,554,101

Patente estadounidense 4,578,770

Patente estadounidense 4,596,792

Patente estadounidense 4,599,230

Patente estadounidense 4,599,231

Patente estadounidense 4,601,903

Patente estadounidense 4,608,251

- Patente estadounidense 4,683,195
- Patente estadounidense 4,683,202
- Patente estadounidense 4,684,611
- Patente estadounidense 4,690,915
- 5 Patente estadounidense 4,690,915
- Patente estadounidense 4,748,018
- Patente estadounidense 4,800,159
- Patente estadounidense 4,879,236
- Patente estadounidense 4,952,500
- 10 Patente estadounidense 5,084,269
- Patente estadounidense 5,199,942
- Patente estadounidense 5,221,605
- Patente estadounidense 5,238,808
- Patente estadounidense 5,302,523
- 15 Patente estadounidense 5,310,687
- Patente estadounidense 5,322,783
- Patente estadounidense 5,384,253
- Patente estadounidense 5,464,765
- Patente estadounidense 5,512,282
- 20 Patente estadounidense 5,512,282
- Patente estadounidense 5,538,877
- Patente estadounidense 5,538,880
- Patente estadounidense 5,548,066
- Patente estadounidense 5,550,318
- 25 Patente estadounidense 5,563,055
- Patente estadounidense 5,580,859
- Patente estadounidense 5,589,466
- Patente estadounidense 5,591,616
- Patente estadounidense 5,610,042
- 30 Patente estadounidense 5,620,896
- Patente estadounidense 5,648,240

- Patente estadounidense 5,656,610
- Patente estadounidense 5,702,932
- Patente estadounidense 5,736,524
- Patente estadounidense 5,780,448
- 5 Patente estadounidense 5,789,215
- Patente estadounidense 5,801,234
- Patente estadounidense 5,840,846
- Patente estadounidense 5,843,650
- Patente estadounidense 5,846,709
- 10 Patente estadounidense 5,846,783
- Patente estadounidense 5,849,497
- Patente estadounidense 5,849,546
- Patente estadounidense 5,849,547
- Patente estadounidense 5,858,652
- 15 Patente estadounidense 5,866,366
- Patente estadounidense 5,871,986
- Patente estadounidense 5,916,776
- Patente estadounidense 5,922,574
- Patente estadounidense 5,925,565
- 20 Patente estadounidense 5,925,565
- Patente estadounidense 5,928,905
- Patente estadounidense 5,928,906
- Patente estadounidense 5,932,451
- Patente estadounidense 5,935,819
- 25 Patente estadounidense 5,935,825
- Patente estadounidense 5,939,291
- Patente estadounidense 5,942,391
- Patente estadounidense 5,945,100
- Patente estadounidense 5,958,895
- 30 Patente estadounidense 5,981,274
- Patente estadounidense 5,994,624

- Patente estadounidense 6,00,8341
- Patente estadounidense 6,288,214
- Patente estadounidense 6,294,177
- Patente estadounidense 6,651,655
- 5 Patente estadounidense 6,656,462
- Patente estadounidense 6,733,754
- Patente estadounidense 6,756,361
- Patente estadounidense 6,770,278
- Patente estadounidense 6,793,923
- 10 Patente estadounidense 6,814,971
- Patente estadounidense 6,936,258
- Patente estadounidense Appln. 2002/0169288
- Patente estadounidense Appln. 2003/0153022
- Abdallah *et al.*, Mol. Microbiol., 62, 667-679, 2006.
- 15 Abdallah *et al.*, Nat. Rev. Microbiol., 5, 883-891, 2007.
- Albus *et al.*, Infect. Immun., 59:1008-1014, 1991.
- An, J. Virol., 71(3):2292-302, 1997.
- Anavi, Sc. thesis from the department of Molecular Microbiology and Biotechnology of the Tel-Aviv University, Israel, 1998.
- 20 Andersen *et al.*, J. Immunol., 154, 3359-3372, 1995.
- Angel *et al.*, Cell, 49:729, 1987b.
- Angel *et al.*, Mol. Cell. Biol., 7:2256, 1987a.
- Archer, Clin. Infect. Dis., 26, 1179-1181, 1998.
- Atchison and Perry, Cell, 46:253, 1986.
- 25 Atchison and Perry, Cell, 48:121, 1987.
- Ausubel *et al.*, In: Current Protocols in Molecular Biology, John, Wiley & Sons, Inc, New York, 1996.
- Baba *et al.*, J. Bacteriol. 190:300-310, 2007.
- Bae and Schneewind, Plasmid, 55:58-63, 2006.
- Bae *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 12312-12317, 2004.
- 30 Banerji *et al.*, Cell, 27(2 Pt 1):299-308, 1981.
- Banerji *et al.*, Cell, 33(3):729-740, 1983.

- Barany and Merrifield, In: The Peptides, Gross and Meienhofer (Eds.), Academic Press, NY, 1-284, 1979.
- Behring EA. Über das Zustandekommen der Diphtherie - Immunität bei Thieren. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 16:1145-8, 1890.
- Bellus, J. Macromol. Sci. PureAppl. Chem., A31(1): 1355-1376, 1994.
- 5 Berkhout *et al.*, Cell, 59:273-282, 1989.
- Birch-Hirschfeld, L. 1934. Über die Agglutination von Staphylokokken durch Bestandteile des Säugetierblutplasmas. Klinische Wochenschrift 13:331.
- Bjerketorp *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 234:309-314, 2004.
- Blonar *et al.*, EMBO J., 8:1139, 1989.
- 10 Bodine and Ley, EMBO J., 6:2997, 1987.
- Borrebaeck, In: Antibody Engineering--A Practical Guide, W. H. Freeman and Co., 1992.
- Boshart *et al.*, Cell, 41:521, 1985.
- Bosze *et al.*, EMBO J., 5(7):1615-1623, 1986.
- Boucher and Corey. Clin. Infect. Dis. 46:S334-S349, 2008..
- 15 Braddock *et al.*, Cell, 58:269, 1989.
- Brown *et al.*, Biochemistry, 37:4397-4406, 1998.
- Bubeck Wardenburg and Schneewind. J. Exp. Med. 205:287-294, 2008.
- Bubeck-Wardenburg *et al.*, Infect. Immun. 74:1040-1044, 2007.
- Bubeck-Wardenburg *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:13831-13836, 2006.
- 20 Bulla and Siddiqui, J. Virol., 62:1437, 1986.
- Burke *et al.*, J. Inf. Dis., 170:1110-1119, 1994.
- Burlak *et al.*, Cell Microbiol., 9:1172-1190, 2007.
- Burts and Missiakas, Mol. Microbiol., 69:736-46, 2008.
- Burts *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:1169-1174, 2005.
- 25 Campbell and Villarreal, Mol. Cell. Biol., 8:1993, 1988.
- Campere and Tilghman, Genes and Dev., 3:537, 1989.
- Campo *et al.*, Nature, 303:77, 1983.
- Carbonelli *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 177(1):75-82, 1999.
- Cedergren *et al.*, Protein Eng., 6:441-448, 1993..
- 30 Celander and Haseltine, J. Virology, 61:269, 1987.
- Celander *et al.*, J. Virology, 62:1314, 1988.
- Cespedes *et al.*, J. Infect. Dis., 191(3):444-52, 2005.

- Champion *et al.*, Science, 313:1632-1636,2006.
- Chandler *et al.*, Cell, 33:489, 1983.
- Chandler *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(8):3596-601, 1997.
- Chang *et al.*, Lancet., 362(9381):362-369, 2003.
- 5 Chang *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9:2153, 1989.
- Chatterjee *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9114,1989.
- Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987.
- Cheng *et al.*, FASEB J., 23:1-12, 2009.
- Choi *et al.*, Cell, 53:519, 1988.
- 10 Cocea, Biotechniques, 23(5):814-816, 1997.
- Cohen *et al.*, J. Cell. Physiol., 5:75, 1987.
- Cosgrove *et al.*, Infect. Control Hosp. Epidemiol. 26:166-174, 2005.
- Costa *et al.*, Mol. Cell. Biol, 8:81, 1988.
- Cripe *et al.*, EMBO J., 6:3745, 1987.
- 15 Culotta and Hamer, Mol. Cell. Biol., 9:1376,1989.
- Dalbey and Wickner, J. Biol. Chem., 260:15925-15931, 1985.
- Dandolo *et al.*, J. Virology, 47:55-64, 1983.
- De Villiers *et al.*, Nature, 312(5991):242-246, 1984.
- DeBord *et al.*, Infect. Immun., 74:4910-4914, 2006.
- 20 DeDent *et al.*, EMBO J. 27:2656-2668,2008.
- DeDent *et al.*, J. Bacteriol. 189:4473-4484,2007.
- Deisenhofer *et al.*, Hoppe-Seyh Zeitsch. Physiol. Chem. 359:975-985, 1978..
- Deisenhofer, Biochemistry 20:2361-2370, 1981.
- Deschamps *et al.*, Science, 230:1174-1177,1985.
- 25 Devereux *et al.*, Nucl. Acid Res., 12:387-395,1984.
- Diep *et al.*, J. Infect. Dis., 193:1495-1503, 2006a.
- Diep *et al.*, Lancet., 367:731-739, 2006b.
- Dinges *et al.*, Clin. Microbiol. Rev., 13:16-34,2000.
- Duthie and Lorenz, J. Gen. Microbiol., 6:95-107, 1952.
- 30 Edbrooke *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9:1908, 989.
- Edlund *et al.*, Science, 230:912-916, 1985.

- Ekstedt and Yotis, Ann. N.Y. Acad. Sci., 80:496-500, 1960.
- Emori and Gaynes, Clin. Microbiol. Rev., 6:428-442, 1993.
- EP 0786519
- EP 497524
- 5 EP 497525
- Epitope Mapping Protocols In: Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Morris (Ed.), 1996.
- Fechheimer, *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.
- Feng and Holland, Nature, 334:6178, 1988.
- Field and Smith, J. Comp. Pathol., 55:63, 1945.
- 10 Firak and Subramanian, Mol. Cell. Biol., 6:3667,1986.
- Foecking and Hofstetter, Gene, 45(1):101-105, 1986.
- Fortune *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 102:10676-10681, 2005.
- Foster, Nat. Rev. Microbiol., 3:948-958, 2005.
- Fournier *et al.*, Infect. Immun., 45:87-93,1984.
- 15 Fraley *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979.
- Friedrich *et al.*, Nature, 425:535-539, 2003.
- Fujita *et al.*, Cell, 49:357, 1987.
- GB Appln. 2 202 328
- Gilles *et al.*, Cell, 33:717,1983.
- 20 Gloss *et al.*, EMBO J., 6:3735, 1987.
- Godbout *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:1169, 1988.
- Gomez *et al.*, EMBO J. 26:701-709,2007..
- Gomez *et al.*, J. Biol. Chem. 281:20190-20196, 2006..
- Gomez *et al.*, Nature Med. 10:842-8,2004.
- 25 Goodbourn and Maniatis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:1447,1988.
- Goodbourn *et al.*, Cell, 45:601, 1986.
- Goodyear and Silverman, J. Exp. Med., 197:1125-1139, 2003.
- Goodyear and Silverman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 101:11392-11397, 2004..
- Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190,1985.
- 30 Gouda *et al.*, Biochemistry, 31(40):9665-72, 1992.
- Gouda *et al.*, Biochemistry, 37:129-36, 1998.

- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Graille *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97:5399-5404, 2000.
- Greene *et al.*, *Immunology Today*, 10:272, 1989
- Grosschedl and Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985.
- 5 Guinn *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 51:359-370, 2004.
- Guss *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 138:413-420, 1984.
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.
- Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., Chapter 8, 1988.
- 10 Hartleib *et al.*, *Blood* 96:2149-2156, 2000..
- Harvey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:1084-1088, 1986.
- Haslinger and Karin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8572, 1985.
- Hauber and Cullen, *J. Virology*, 62:673,1988.
- Hen *et al.*, *Nature*, 321:249, 1986.
- 15 Hensel *et al.*, *Lymphokine Res.*, 8:347,1989.
- Herr and Clarke, *Cell*, 45:461,1986.
- Hirochika *et al.*, *J. Virol.*, 61:2599,1987.
- Hirsch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1959, 1990.
- Holbrook *et al.*, *Virology*, 157:211, 1987.
- 20 Horlick and Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.
- Hsu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:12420-12425, 2003.
- Huang *et al.*, *Cell*, 27:245, 1981.
- Hug *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:3065,1988.
- Huston *et al.*, In: *Methods in Enzymology*, Langone (Ed.), Academic Press, NY, 203:46-88,1991.
- 25 Hwang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.
- Imagawa *et al.*, *Cell*, 51:251, 1987.
- Imbra and Karin, *Nature*, 323:555,1986.
- Imler *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987.
- Imperiale and Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.
- 30 Innis *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(24):9436-9440, 1988.
- Inouye and Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13: 3101-3109, 1985.

- Jakobovits *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:2555,1988.
- Jameel and Siddiqui, Mol. Cell. Biol., 6:710,1986.
- Jansson *et al.*, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 20:69-78 1998.
- Jaynes *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:62,1988.
- 5 Jensen, Acta Path. Microbiol. Scand. 44:421-428, 1958.
- Johnson *et al.*, Methods in Enzymol., 203:88-99, 1991.
- Johnson *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9:3393, 1989.
- Jones, Carb. Research, 340:1097-1106, 2005.
- Jonsson *et al.*, Oral Dis., 8(3):130-140, 2002.
- 10 Joyce *et al.*, Carbohydrate Research 338:903-922 (2003
- Kadesch and Berg, Mol. Cell. Biol., 6:2593,1986.
- Kaeppler *et al.*, Plant Cell Rep., 8:415-418, 1990.
- Kaneda *et al.*, Science, 243:375-378, 1989.
- Karin *et al.*, Mol. Cell. Biol., 7:606, 1987.
- 15 Katinka *et al.*, Cell, 20:393, 1980.
- Kato et al, J Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991.
- Kawamoto *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:267, 1988.
- Kennedy *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:1327-1332, 2008.
- Kiledjian *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:145, 1988.
- 20 Kinoshita, M., N. Kobayashi, S. Nagashima, M. Ishino, S. Otokozawa, K. Mise, A. Sumi, H. Tsutsumi, N. Uehara, N. Watanabe, and M. Endo. 2008. Diversity of staphylocoagulase and identification of novel variants of staphylocoagulase gene in *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Immunol.s 52:334-348.
- Klamut *et al.*, Mol. Cell. Biol., 10:193,1990.
- Klevens *et al.*, Clin. Infect. Dis., 2008; 47:927-30, 2008.
- 25 Klevens *et al.*, JAMA, 298:1763-1771, 2007.
- Koch *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9:303, 1989.
- Kohler and Milstein, Nature 256:495-497 (1975
- Kriegler and Botchan, In: Eukaryotic Viral Vectors, Gluzman (Ed.), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- 30 Kriegler and Botchan, Mol. Cell. Biol., 3:325,1983.
- Kriegler *et al.*, Cell, 38:483, 1984a.
- Kriegler *et al.*, Cell, 53:45, 1988.

- Kriegler *et al.*, In: Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes, Van de Woude et al. eds, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984b.
- Kroh *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106:7786-7791, 2009.
- Kuhl *et al.*, Cell, 50:1057, 1987.
- 5 Kuklin *et al.*, Infect. Immun., 74:2215-23, 2006.
- Kunz *et al.*, Nucl. Acids Res., 17:1121, 1989.
- Kuroda *et al.*, Lancet., 357:1225-1240, 2001.
- Kyte and Doolittle, J. Mol. Biol., 157(1):105-132, 1982.
- Lagergard *et al.*, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11:341-5, 1992.
- 10 Lam *et al.*, J. Bacteriol., 86:87-91, 1963.
- Larsen *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA., 83:8283, 1986, 1963.
- Laschia *et al.*, Cell, 59:283, 1989.
- Latimer *et al.*, Mol. Cell. Biol., 10:760, 1990.
- Lee *et al.*, Nature, 294:228, 1981.
- 15 Lee *et al.*, Nucleic Acids Res., 12:4191-206, 1984.
- Lee, Trends Microbiol. 4(4):162-166, 1996.
- Levenson *et al.*, Hum. Gene Ther., 9(8):1233-1236, 1998.
- Levinson *et al.*, Nature, 295:79, 1982.
- Lin *et al.*, Mol. Cell. Biol., 10:850, 1990.
- 20 Lowy, New Engl. J. Med., 339:520-532, 1998.
- Luria *et al.*, EMBO J., 6:3307, 1987.
- Lusky and Botchan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:3609, 1986.
- Lusky *et al.*, Mol. Cell. Biol., 3:1108, 1983.
- Macejak and Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991.
- 25 MacGurn *et al.*, Mol. Microbiol., 57:1653-1663, 2005.
- Maira-Litran *et al.*, Infect. Immun., 70:4433-4440, 2002.
- Maira-Litran *et al.*, Vaccine, 22:872-879, 2004.
- Majors and Varmus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:5866, 1983.
- Markwardt, Untersuchungen über Hirudin. Naturwissenschaften, 41:537-538, 1955.
- 30 Mazmanian *et al.*, Mol. Microbiol. 40, 1049-1057, 2001.
- Mazmanian *et al.*, Mol. Microbiol., 40(5):1049-1057, 2001.

- Mazmanian *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:5510-5515, 2000.
- Mazmanian *et al.*, Science, 285(5428):760-3,1999.
- McLaughlin *et al.*, PLoS Pathog., 3:e105, 2007.
- McNeall *et al.*, Gene, 76:81, 1989.
- 5 Mernaugh *et al.*, In: Molecular Methods in Plant Pathology, Singh et al. (Eds.), CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 359-365, 1995.
- Merrifield, Science, 232(4748):34-1-347, 1986.
- Miksicek *et al.*, Cell, 46:203, 1986.
- Mordacq and Linzer, Genes and Dev., 3:760, 1989.
- 10 Moreau *et al.*, Carbohydrate Res., 201:285-297, 1990.
- Moreau *et al.*, Nucl. Acids Res., 9:6047, 1981.
- Moreillon *et al.*, Infect. Immun., 63:4738-4743,1995.
- Moreillon *et al.*, Infect. Immun., 63:4738-4743,1995.
- Mosmann and Coffman, Ann. Rev. Immunol., 7:145-173,1989.
- 15 Muesing *et al.*, Cell, 48:691, 1987.
- Musher *et al.*, Medicine (Baltimore), 73:186-208, 1994.
- Navarre and Schneewind, J. Biol. Chem., 274:15847-15856, 1999.
- Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443, 1970.
- Ng *et al.*, Nuc. Acids Res., 17:601, 1989.
- 20 Nicolau and Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, Methods Enzymol., 149:157-176, 1987.
- Novick, Mol. Microbiol., 48:1429-1449, 2003.
- O'Brien *et al.*, Mol. Microbiol. 44:1033-1044, 2002.
- O'Seaghda *et al.*, FEBS J. 273:4831-4841,2006..
- 25 Omirulleh *et al.*, Plant Mol. Biol., 21(3):415-28, 1993.
- Ondek *et al.*, EMBO J., 6:1017, 1987.
- Ornitz *et al.*, Mol. Cell. Biol., 7:3466, 1987.
- Pallen, Trends Microbiol., 10:209-212, 2002.
- Palmiter *et al.*, Nature, 300:611, 1982.
- 30 Palmqvist *et al.*, Microbes. Infect., 7:1501-11, 2005.
- Panizzi *et al.*, J. Biol. Chem., 281:1179-1187, 2006.

- PCT Appln. PCT/US89/01025
- PCT Appln. WO 00/02523
- PCT Appln. WO 00/12132
- PCT Appln. WO 00/12689
- 5 PCT Appln. WO 00/15238
- PCT Appln. WO 01/34809
- PCT Appln. WO 01/60852
- PCT Appln. WO 01/98499
- PCT Appln. WO 02/059148
- 10 PCT Appln. WO 02/094868
- PCT Appln. WO 03/53462
- PCT Appln. WO 04/43407
- PCT Appln. WO 06/032472
- PCT Appln. WO 06/032475
- 15 PCT Appln. WO 06/032500
- PCT Appln. WO 07/113222
- PCT Appln. WO 07/113223
- PCT Appln. WO 94/09699
- PCT Appln. WO 95/06128
- 20 PCT Appln. WO 95/08348
- PCT Appln. WO 98/57994
- Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444, 1988.
- Pech *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9:396, 1989.
- Pelletier and Sonenberg, Nature, 334(6180):320-325, 1988.
- 25 Perez-Stable and Constantini, Mol. Cell. Biol., 10:1116, 1990.
- Phonimdaeng *et al.*, Mol. Microbiol., 4:393-404, 1990.
- Picard and Schaffner, Nature, 307:83, 1984.
- Pinkert *et al.*, Genes and Dev., 1:268, 1987.
- Ponta *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:1020, 1985.
- 30 Porton *et al.*, Mol. Cell. Biol., 10:1076, 1990.
- Potrykus *et al.*, Mol. Gen. Genet., 199(2):169-177, 1985.

- Pugsley, Microbiol. Rev., 57:50-108, 1993.
- Pym *et al.*, Mol. Microbiol., 46:709-717, 2002.
- Pym *et al.*, Nat. Med., 9:533-539, 2003.
- Queen and Baltimore, Cell, 35:741, 1983.
- 5 Quinn *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9:4713, 1989.
- Redondo *et al.*, Science, 247:1225, 1990.
- Reisman and Rotter, Mol. Cell. Biol., 9:3571, 1989.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1289-1329, 1990.
- Resendez Jr. *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:4579, 1988.
- 10 Ripe *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9:2224,1989.
- Rippe, *et al.*, Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990.
- Rittling *et al.*, Nuc. Acids Res., 17:1619, 1989.
- Roben *et al.*, J. Immunol. 154:6437-6445, 1995.
- Rosen *et al.*, Cell, 41:813,1988.
- 15 Sakai *et al.*, Genes and Dev., 2:1144, 1988.
- Salid-Salim *et al.*, Infect. Control Hosp. Epidemiol. 24:451-455, 2003.
- Sambrook *et al.*, In: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- Schaffner *et al.*, J. Mol. Biol., 201:81, 1988.
- Schneewind *et al.*, Cell 70:267-281,1992.
- 20 Schneewind *et al.*, EMBO, 12:4803-4811, 1993.
- Schneewind *et al.*, Science, 268:103-6, 1995.
- Searle *et al.*, Mol. Cell. Biol., 5:1480, 1985.
- Sharp and Marciniak, Cell, 59:229, 1989.
- Shaul and Ben-Levy, EMBO J., 6:1913, 1987.
- 25 Shaw *et al.*, Microbiology, 150:217-228, 2004.
- Sheagren, N. Engl. J. Med. 310:1368-1373,1984.
- Sherman *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9:50, 1989.
- Shopsin *et al.*, J. Clin. Microbiol., 37:3556-63, 1999.
- Sibbald *et al.*, Microbiol. Mol Biol. Rev., 70:755-788, 2006.
- 30 Silverman and Goodyear. Nat. Rev. Immunol., 6:465-75, 2006.
- Sjodahl, Eur. J. Biochem. 73:343-351, 1977.

- Sjoquist *et al.*, Eur. J. Biochem. 30:190-194, 1972.
- Sleigh and Lockett, J. EMBO, 4:3831, 1985.
- Smith & Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482,1981.
- Smith *et al.*, Brit. J. Exp. Pathol., 28:57, 1947.
- 5 Sorensen *et al.*, Infect. Immun., 63:1710-1717, 1995.
- Spalholz *et al.*, Cell, 42:183, 1985.
- Spandau and Lee, J. Virology, 62:427, 1988.
- Spandidos and Wilkie, EMBO J., 2:1193,1983.
- Stanley *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:13001-13006,2003.
- 10 Stephens and Hentschel, Biochem. J., 248:1, 1987.
- Stewart and Young, In: Solid Phase Peptide Synthesis, 2d. ed., Pierce Chemical Co., 1984.
- Stranger-Jones *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 103:16942-16947,2006.
- Stuart *et al.*, Nature, 317:828; 1985.
- Studier *et al.*, Methods Enzymol. 185:60-89 1990.
- 15 Sullivan and Peterlin, Mol. Cell. Biol., 7:3315, 1987.
- Swartzendruber and Lehman, J. Cell. Physiology, 85:179,1975.
- Takebe *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:466, 1988.
- Tam *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 105:6442, 1983.
- Tavernier *et al.*, Nature, 301:634, 1983.
- 20 Taylor and Kingston, Mol. Cell. Biol., 10:165, 1990a.
- Taylor and Kingston, Mol. Cell. Biol., 10:176, 1990b.
- Taylor *et al.*, J. Biol. Chem., 264:15160, 1989.
- Thiesen *et al.*, J. Virology, 62:614, 1988.
- Thomson *et al.*, J. Immunol., 157(2):822-826, 1996.
- 25 Tigges *et al.*, J. Immunol., 156(10):3901-3910, 1996.
- Tigges *et al.*, J. Immunol., 156(10):3901-3910, 1996.
- Ton-That *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(22):12424-9, 1999.
- Treisman, Cell, 42:889, 1985.
- Tronche *et al.*, Mol. Biol. Med., 7:173, 1990.
- 30 Trudel and Constantini, Genes and Dev., 6:954, 1987.
- Tyndell *et al.*, Nuc. Acids. Res., 9:6231, 1981.

- Uhlen *et al.*, J. Biol. Chem. 259:1695-1702 and 13628 (Corr.) 1984.
- van den Ent and Lowe, FEBS Lett., 579:3837-3841, 2005.
- van Wely *et al.*, FEMS Microbiol. Rev., 25:437-454, 2001.
- Vannice and Levinson, J. Virology, 62:1305, 1988.
- 5 Vasseur *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 77:1068, 1980.
- Vaughan, *et al.*, Nat. Biotech. 16; 535-539, 1998.
- Wang and Calame, Cell, 47:241, 1986.
- Weber *et al.*, Cell, 36:983,1984.
- Weinberger et al. Mol. Cell. Biol., 8:988, 1984.
- 10 Weiss *et al.*, J. Antimicrob. Chemother., 53(3):480-6, 2004.
- Winoto and Baltimore, Cell, 59:649,1989.
- Wong *et al.*, Gene, 10:87-94, 1980.
- Xu *et al.*, J. Infect. Dis., 189:2323-2333,2004.
- Xu *et al.*, Mol. Microbiol., 66(3):787-800, 2007.
- 15 Yutzey et al. Mol. Cell. Biol., 9:1397,1989.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SCHNEEWIND, OLAF CHENG, ALICE G. MISSIAKAS, DOMINIQUE M. KIM, HWAN

5 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADO CON VARIANTES DE LA PROTEÍNA A (SpA)

<130> ARCD:482WO

<140> DESCONOCIDO

10 <141> 2010-04-05

<150> 61/237,956

<151> 2009-12-18

15 <160> 63

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

20 <211> 150

<212> ADN

<213> Staphylococcus sp.

<400> 1

25 **ttcaacaaag atcaacaaag cgccttctat gaaatcttga acatgcctaa cttaaacgaa 60**

gcgcaacgta acggcttcat tcaaagtctt aaagacgacc caagccaaag cactaatgtt 120

ttaggtgaag ctaaaaaatt aaacgaatct 150

<210> 2

<211> 54

30 <212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 2

Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile
1 5 10 15

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln
20 25 30

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

35 **Lys Lys Leu Asn Glu Ser**
50

<210> 3

<211> 51

<212> PRT

40 <213> Staphylococcus sp.

<400> 3

Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn Met

ES 2 563 646 T3

1 5 10 15

Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu
35 40 45

Asn Asp Ser
50

<210> 4

<211> 52

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 4

Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn
1 5 10 15

Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
20 25 30

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys
35 40 45

Leu Asn Glu Ser
50

<210> 5

<211> 52

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 5

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
1 5 10 15

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

Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys
35 40 45

Leu Asn Asp Ala
50

<210> 6
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.

5

<400> 6

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His
1 5 10 15

Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
20 25 30

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys
35 40 45

Leu Asn Asp Ala
50

10

<210> 7
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (34)..(35)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25

<400> 7

Asn Asn Phe Asn Lys Asp Xaa Xaa Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn
1 5 10 15

Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
20 25 30

Lys Xaa Xaa Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys
35 40 45

Leu Asn Glu Ser
50

30

<210> 8
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(8)

<223> donde X es cualquier aminoácido distinto de Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (12)..(35)

<223> donde Y es cualquier aminoácido distinto de D

<400> 8

Asn Asn Phe Asn Lys Asp Xaa Xaa Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn
1 5 10 15

Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu
20 25 30

Lys Tyr Tyr Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys
35 40 45

Leu Asn Glu Ser
50

10

<210> 9

<211> 450

<212> PRT

15 <213> Staphylococcus sp.

<400> 9

ES 2 563 646 T3

Met	Lys	Lys	Lys	Asn	Ile	Tyr	Ser	Ile	Arg	Lys	Leu	Gly	Val	Gly	Ile	1	5	10	15
Ala	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	Ile	Ser	Gly	Gly	Val	Thr	Pro	20	25	30	
Ala	Ala	Asn	Ala	Ala	Gln	His	Asp	Glu	Ala	Gln	Gln	Asn	Ala	Phe	Tyr	35	40	45	
Gln	Val	Leu	Asn	Met	Pro	Asn	Leu	Asn	Ala	Asp	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	50	55	60	
Ile	Gln	Ser	Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Ala	Asn	Val	Leu	Gly	65	70	75	80
Glu	Ala	Gln	Lys	Leu	Asn	Asp	Ser	Gln	Ala	Pro	Lys	Ala	Asp	Ala	Gln	85	90	95	
Gln	Asn	Asn	Phe	Asn	Lys	Asp	Gln	Gln	Ser	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ile	Leu	100	105	110	
Asn	Met	Pro	Asn	Leu	Asn	Glu	Ala	Gln	Arg	Asn	Gly	Phe	Ile	Gln	Ser	115	120	125	
Leu	Lys	Asp	Asp	Pro	Ser	Gln	Ser	Thr	Asn	Val	Leu	Gly	Glu	Ala	Lys	130	135	140	

Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys
 145 150 155 160

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn
 165 170 175

Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
 180 185 190

Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln
 195 200 205

Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe
 210 215 220

Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly
 225 230 235 240

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu
 245 250 255

Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Glu Glu Asp
 260 265 270

Asn Lys Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 275 280 285

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 290 295 300

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 305 310 315 320

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 325 330 335

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 340 345 350

Gly Asn Gly Val His Val Val Lys Pro Gly Asp Thr Val Asn Asp Ile
 355 360 365

Ala Lys Ala Asn Gly Thr Thr Ala Asp Lys Ile Ala Ala Asp Asn Lys
 370 375 380

Leu Ala Asp Lys Asn Met Ile Lys Pro Gly Gln Glu Leu Val Val Asp
 385 390 395 400

Lys Lys Gln Pro Ala Asn His Ala Asp Ala Asn Lys Ala Gln Ala Leu

ES 2 563 646 T3

405

410

415

Pro Glu Thr Gly Glu Glu Asn Pro Phe Ile Gly Thr Thr Val Phe Gly
420 425 430

Gly Leu Ser Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Gly Arg Arg Arg
435 440 445

Glu Leu
450

<210> 10

<211> 450

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 10

ES 2 563 646 T3

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

Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
 180 185 190

Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln
 195 200 205

Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe
 210 215 220

Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly
 225 230 235 240

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu
 245 250 255

Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Glu Glu Asp
 260 265 270

Asn Lys Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 275 280 285

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 290 295 300

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 305 310 315 320

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 325 330 335

Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp
 340 345 350

Gly Asn Gly Val His Val Val Lys Pro Gly Asp Thr Val Asn Asp Ile
 355 360 365

Ala Lys Ala Asn Gly Thr Thr Ala Asp Lys Ile Ala Ala Asp Asn Lys
 370 375 380

Leu Ala Asp Lys Asn Met Ile Lys Pro Gly Gln Glu Leu Val Val Asp
 385 390 395 400

Lys Lys Gln Pro Ala Asn His Ala Asp Ala Asn Lys Ala Gln Ala Leu
 405 410 415

Pro Glu Thr Gly Glu Glu Asn Pro Phe Ile Gly Thr Thr Val Phe Gly
 420 425 430

Gly Leu Ser Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu Leu Ala Gly Arg Arg Arg
435 440 445

Glu Leu
450

<210> 11
<211> 97
<212> PRT
<213> Staphylococcus sp.

<400> 11

Met Ala Met Ile Lys Met Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys Ser Gln
1 5 10 15

Ser Tyr Gly Gln Gly Ser Asp Gln Ile Arg Gln Ile Leu Ser Asp Leu
20 25 30

Thr Arg Ala Gln Gly Glu Ile Ala Ala Asn Trp Glu Gly Gln Ala Phe
35 40 45

Ser Arg Phe Glu Glu Gln Phe Gln Gln Leu Ser Pro Lys Val Glu Lys
50 55 60

Phe Ala Gln Leu Leu Glu Glu Ile Lys Gln Gln Leu Asn Ser Thr Ala
65 70 75 80

Asp Ala Val Gln Glu Gln Asp Gln Gln Leu Ser Asn Asn Phe Gly Leu
85 90 95

Gln

<210> 12
<211> 102
<212> PRT
<213> Staphylococcus sp.

<400> 12

Met Gly Gly Tyr Lys Gly Ile Lys Ala Asp Gly Gly Lys Val Asn Gln
1 5 10 15

Ala Lys Gln Leu Ala Ala Lys Ile Ala Lys Asp Ile Glu Ala Cys Gln
20 25 30

Lys Gln Thr Gln Gln Leu Ala Glu Tyr Ile Glu Gly Ser Asp Trp Glu
35 40 45

Gly Gln Phe Ala Asn Lys Val Lys Asp Val Leu Leu Ile Met Ala Lys
50 55 60
Phe Gln Glu Glu Leu Val Gln Pro Met Ala Asp His Gln Lys Ala Ile
65 70 75 80

Asp Asn Leu Ser Gln Asn Leu Ala Lys Tyr Asp Thr Leu Ser Ile Lys
85 90 95

Gln Gly Leu Asp Arg Val
100

<210> 13
<211> 1385
<212> PRT
<213> Staphylococcus sp.

<400> 13

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

ES 2 563 646 T3

180						185						190					
Asp	Ala	Ile	Lys	Ser	Asn	Ala	Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Asn	Asn	Ser	Asn		
		195					200					205					
Ser	Asn	Asn	Glu	Asn	Asn	Ala	Asp	Ile	Ile	Leu	Pro	Lys	Ser	Thr	Ala		
	210					215					220						
Pro	Lys	Ser	Leu	Asn	Thr	Arg	Met	Arg	Met	Ala	Ala	Ile	Gln	Pro	Asn		
225					230					235					240		
Ser	Thr	Asp	Ser	Lys	Asn	Val	Asn	Asp	Leu	Ile	Thr	Ser	Asn	Thr	Thr		
				245					250					255			
Leu	Thr	Val	Val	Asp	Ala	Asp	Asn	Ser	Lys	Thr	Ile	Val	Pro	Ala	Gln		
			260					265					270				
Asp	Tyr	Leu	Ser	Leu	Lys	Ser	Gln	Ile	Thr	Val	Asp	Asp	Lys	Val	Lys		
		275					280					285					
Ser	Gly	Asp	Tyr	Phe	Thr	Ile	Lys	Tyr	Ser	Asp	Thr	Val	Gln	Val	Tyr		
	290					295					300						
Gly	Leu	Asn	Pro	Glu	Asp	Ile	Lys	Asn	Ile	Gly	Asp	Ile	Lys	Asp	Pro		
305					310					315					320		
Asn	Asn	Gly	Glu	Thr	Ile	Ala	Thr	Ala	Lys	His	Asp	Thr	Ala	Asn	Asn		
				325					330					335			
Leu	Ile	Thr	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Val	Asp	Arg	Phe	Asn	Ser	Val		
			340					345					350				
Lys	Met	Gly	Ile	Asn	Tyr	Ser	Ile	Tyr	Met	Asp	Ala	Asp	Thr	Ile	Pro		
		355					360					365					
Val	Asp	Lys	Lys	Asp	Val	Pro	Phe	Ser	Val	Thr	Ile	Gly	Asn	Gln	Ile		
	370					375					380						
Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Ile	Thr	Tyr	Pro	Ala	Tyr	Lys	Glu	Ala	Asp		
385					390					395					400		
Asn	Asn	Ser	Ile	Gly	Ser	Ala	Phe	Thr	Glu	Thr	Val	Ser	His	Val	Gly		
				405					410					415			
Asn	Val	Glu	Asp	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Gln	Val	Val	Tyr	Val	Asn	Pro		
			420					425					430				
Met	Asp	Lys	Asp	Leu	Lys	Gly	Ala	Lys	Leu	Lys	Val	Glu	Ala	Tyr	His		
		435					440					445					

ES 2 563 646 T3

Pro Lys Tyr Pro Thr Asn Ile Gly Gln Ile Asn Gln Asn Val Thr Asn
450 455 460

Ile Lys Ile Tyr Arg Val Pro Glu Gly Tyr Thr Leu Asn Lys Gly Tyr
465 470 475 480

Asp Val Asn Thr Asn Asp Leu Val Asp Val Thr Asp Glu Phe Lys Asn
485 490 495

Lys Met Thr Tyr Gly Ser Asn Gln Ser Val Asn Leu Asp Phe Gly Asp
500 505 510

Ile Thr Ser Ala Tyr Val Val Met Val Asn Thr Lys Phe Gln Tyr Thr
515 520 525

Asn Ser Glu Ser Pro Thr Leu Val Gln Met Ala Thr Leu Ser Ser Thr
530 535 540

Gly Asn Lys Ser Val Ser Thr Gly Asn Ala Leu Gly Phe Thr Asn Asn
545 550 555 560

Gln Ser Gly Gly Ala Gly Gln Glu Val Tyr Lys Ile Gly Asn Tyr Val
565 570 575

Trp Glu Asp Thr Asn Lys Asn Gly Val Gln Glu Leu Gly Glu Lys Gly
580 585 590

Val Gly Asn Val Thr Val Thr Val Phe Asp Asn Asn Thr Asn Thr Lys
595 600 605

Val Gly Glu Ala Val Thr Lys Glu Asp Gly Ser Tyr Leu Ile Pro Asn
610 615 620

Leu Pro Asn Gly Asp Tyr Arg Val Glu Phe Ser Asn Leu Pro Lys Gly
625 630 635 640

Tyr Glu Val Thr Pro Ser Lys Gln Gly Asn Asn Glu Glu Leu Asp Ser
645 650 655

Asn Gly Leu Ser Ser Val Ile Thr Val Asn Gly Lys Asp Asn Leu Ser
660 665 670

Ala Asp Leu Gly Ile Tyr Lys Pro Lys Tyr Asn Leu Gly Asp Tyr Val
675 680 685

Trp Glu Asp Thr Asn Lys Asn Gly Ile Gln Asp Gln Asp Glu Lys Gly
690 695 700

Ile	Ser	Gly	Val	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asn	Val	Leu	705	710	715	720
Lys	Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Ala	Asp	Gly	Lys	Tyr	Lys	Phe	Thr	Asp	Leu	725	730	735	
Asp	Asn	Gly	Asn	Tyr	Lys	Val	Glu	Phe	Thr	Thr	Pro	Glu	Gly	Tyr	Thr	740	745	750	
Pro	Thr	Thr	Val	Thr	Ser	Gly	Ser	Asp	Ile	Glu	Lys	Asp	Ser	Asn	Gly	755	760	765	
Leu	Thr	Thr	Thr	Gly	Val	Ile	Asn	Gly	Ala	Asp	Asn	Met	Thr	Leu	Asp	770	775	780	
Ser	Gly	Phe	Tyr	Lys	Thr	Pro	Lys	Tyr	Asn	Leu	Gly	Asn	Tyr	Val	Trp	785	790	795	800
Glu	Asp	Thr	Asn	Lys	Asp	Gly	Lys	Gln	Asp	Ser	Thr	Glu	Lys	Gly	Ile	805	810	815	
Ser	Gly	Val	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Asn	Glu	Asn	Gly	Glu	Val	Leu	Gln	820	825	830	
Thr	Thr	Lys	Thr	Asp	Lys	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gln	Phe	Thr	Gly	Leu	Glu	835	840	845	
Asn	Gly	Thr	Tyr	Lys	Val	Glu	Phe	Glu	Thr	Pro	Ser	Gly	Tyr	Thr	Pro	850	855	860	
Thr	Gln	Val	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Glu	Gly	Ile	Asp	Ser	Asn	Gly	Thr	865	870	875	880
Ser	Thr	Thr	Gly	Val	Ile	Lys	Asp	Lys	Asp	Asn	Asp	Thr	Ile	Asp	Ser	885	890	895	
Gly	Phe	Tyr	Lys	Pro	Thr	Tyr	Asn	Leu	Gly	Asp	Tyr	Val	Trp	Glu	Asp	900	905	910	
Thr	Asn	Lys	Asn	Gly	Val	Gln	Asp	Lys	Asp	Glu	Lys	Gly	Ile	Ser	Gly	915	920	925	
Val	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Asp	Glu	Asn	Asp	Lys	Val	Leu	Lys	Thr	Val	930	935	940	
Thr	Thr	Asp	Glu	Asn	Gly	Lys	Tyr	Gln	Phe	Thr	Asp	Leu	Asn	Asn	Gly	945	950	955	960

Thr	Tyr	Lys	Val	Glu	Phe	Glu	Thr	Pro	Ser	Gly	Tyr	Thr	Pro	Thr	Ser	
				965					970					975		
Val	Thr	Ser	Gly	Asn	Asp	Thr	Glu	Lys	Asp	Ser	Asn	Gly	Leu	Thr	Thr	
			980					985					990			
Thr	Gly	Val	Ile	Lys	Asp	Ala	Asp	Asn	Met	Thr	Leu	Asp	Ser	Gly	Phe	
		995					1000					1005				
Tyr	Lys	Thr	Pro	Lys	Tyr	Ser	Leu	Gly	Asp	Tyr	Val	Trp	Tyr	Asp		
	1010					1015					1020					
Ser	Asn	Lys	Asp	Gly	Lys	Gln	Asp	Ser	Thr	Glu	Lys	Gly	Ile	Lys		
	1025					1030					1035					
Asp	Val	Lys	Val	Ile	Leu	Leu	Asn	Glu	Lys	Gly	Glu	Val	Ile	Gly		
	1040					1045					1050					
Thr	Thr	Lys	Thr	Asp	Glu	Asn	Gly	Lys	Tyr	Arg	Phe	Asp	Asn	Leu		
	1055					1060					1065					
Asp	Ser	Gly	Lys	Tyr	Lys	Val	Ile	Phe	Glu	Lys	Pro	Thr	Gly	Leu		
	1070					1075					1080					
Thr	Gln	Thr	Gly	Thr	Asn	Thr	Thr	Glu	Asp	Asp	Lys	Asp	Ala	Asp		
	1085					1090					1095					
Gly	Gly	Glu	Val	Asp	Val	Thr	Ile	Thr	Asp	His	Asp	Asp	Phe	Thr		
	1100					1105					1110					
Leu	Asp	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Glu	Glu	Glu	Thr	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser		
	1115					1120					1125					
Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp		
	1130					1135					1140					
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser		
	1145					1150					1155					
Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp		
	1160					1165					1170					
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser		
	1175					1180					1185					
Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp		
	1190					1195					1200					
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser		

1205	1210	1215
Asp Ser 1220	Asp Ser Asp Ser 1225	Asp Ser Asp 1230
Ser Asp 1235	Ser Asp Ser Asp 1240	Ser Asp Ser 1245
Asp Ser 1250	Asp Ser Asp Ser 1255	Ser Asp Ser Asp 1260
Ser Asp 1265	Ser Asp Ser Asp 1270	Ser Asp Ser 1275
Asp Ser 1280	Asp Ser Asp Ser 1285	Ser Asp Ser Asp 1290
Ser Asp 1295	Ser Asp Ser Asp 1300	Ser Asp Ser 1305
Asp Ser 1310	Asp Ser Asp Ser 1315	Ser Asp Ser Asp 1320
Ser Asp 1325	Ala Gly Lys His Thr 1330	Pro Val Lys Pro Met 1335
Lys Asp 1340	His His Asn Lys Ala 1345	Lys Ala Leu Pro Glu 1350
Glu Asn 1355	Ser Gly Ser Asn Asn 1360	Ala Thr Leu Phe Gly 1365
Ala Ala 1370	Leu Gly Ser Leu Leu 1375	Leu Phe Gly Arg Arg 1380
Asn Lys 1385		Lys Lys Gln

<210> 14
<211> 1141

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 14

5

Met	Ile	Asn	Arg	Asp	Asn	Lys	Lys	Ala	Ile	Thr	Lys	Lys	Gly	Met	Ile
1				5					10					15	
Ser	Asn	Arg	Leu	Asn	Lys	Phe	Ser	Ile	Arg	Lys	Tyr	Thr	Val	Gly	Thr
			20					25					30		

Ala Ser Ile Leu Val Gly Thr Thr Leu Ile Phe Gly Leu Gly Asn Gln
35 40 45

Glu Ala Lys Ala Ala Glu Asn Thr Ser Thr Glu Asn Ala Lys Gln Asp
50 55 60

Asp Ala Thr Thr Ser Asp Asn Lys Glu Val Val Ser Glu Thr Glu Asn
65 70 75 80

Asn Ser Thr Thr Glu Asn Asp Ser Thr Asn Pro Ile Lys Lys Glu Thr
85 90 95

Asn Thr Asp Ser Gln Pro Glu Ala Lys Glu Glu Ser Thr Thr Ser Ser
100 105 110

Thr Gln Gln Gln Gln Asn Asn Val Thr Ala Thr Thr Glu Thr Lys Pro
115 120 125

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

Thr Glu Asp Thr Ser Val Ile Leu Glu Glu Lys Lys Ala Pro Asn Tyr
145 150 155 160

Thr Asn Asn Asp Val Thr Thr Lys Pro Ser Thr Ser Glu Ile Gln Thr
165 170 175

Lys Pro Thr Thr Pro Gln Glu Ser Thr Asn Ile Glu Asn Ser Gln Pro
180 185 190

Gln Pro Thr Pro Ser Lys Val Asp Asn Gln Val Thr Asp Ala Thr Asn
195 200 205

Pro Lys Glu Pro Val Asn Val Ser Lys Glu Glu Leu Lys Asn Asn Pro
210 215 220

Glu Lys Leu Lys Glu Leu Val Arg Asn Asp Asn Asn Thr Asp Arg Ser
225 230 235 240

Thr Lys Pro Val Ala Thr Ala Pro Thr Ser Val Ala Pro Lys Arg Leu
245 250 255

Asn Ala Lys Met Arg Phe Ala Val Ala Gln Pro Ala Ala Val Ala Ser
260 265 270

Asn Asn Val Asn Asp Leu Ile Thr Val Thr Lys Gln Thr Ile Lys Val
275 280 285

ES 2 563 646 T3

Gly Asp Gly Lys Asp Asn Val Ala Ala Ala His Asp Gly Lys Asp Ile
 290 295 300
 Glu Tyr Asp Thr Glu Phe Thr Ile Asp Asn Lys Val Lys Lys Gly Asp
 305 310 315 320
 Thr Met Thr Ile Asn Tyr Asp Lys Asn Val Ile Pro Ser Asp Leu Thr
 325 330 335
 Asp Lys Asn Asp Pro Ile Asp Ile Thr Asp Pro Ser Gly Glu Val Ile
 340 345 350
 Ala Lys Gly Thr Phe Asp Lys Ala Thr Lys Gln Ile Thr Tyr Thr Phe
 355 360 365
 Thr Asp Tyr Val Asp Lys Tyr Glu Asp Ile Lys Ala Arg Leu Thr Leu
 370 375 380
 Tyr Ser Tyr Ile Asp Lys Gln Ala Val Pro Asn Glu Thr Ser Leu Asn
 385 390 395 400
 Leu Thr Phe Ala Thr Ala Gly Lys Glu Thr Ser Gln Asn Val Ser Val
 405 410 415
 Asp Tyr Gln Asp Pro Met Val His Gly Asp Ser Asn Ile Gln Ser Ile
 420 425 430
 Phe Thr Lys Leu Asp Glu Asn Lys Gln Thr Ile Glu Gln Gln Ile Tyr
 435 440 445
 Val Asn Pro Leu Lys Lys Thr Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Ile Ala
 450 455 460
 Gly Ser Gln Val Asp Asp Tyr Gly Asn Ile Lys Leu Gly Asn Gly Ser
 465 470 475 480
 Thr Ile Ile Asp Gln Asn Thr Glu Ile Lys Val Tyr Lys Val Asn Pro
 485 490 495
 Asn Gln Gln Leu Pro Gln Ser Asn Arg Ile Tyr Asp Phe Ser Gln Tyr
 500 505 510
 Glu Asp Val Thr Ser Gln Phe Asp Asn Lys Lys Ser Phe Ser Asn Asn
 515 520 525
 Val Ala Thr Leu Asp Phe Gly Asp Ile Asn Ser Ala Tyr Ile Ile Lys
 530 535 540
 Val Val Ser Lys Tyr Thr Pro Thr Ser Asp Gly Glu Leu Asp Ile Ala

ES 2 563 646 T3

545		550		555		560
Gln Gly Thr Ser Met Arg Thr Thr Asp Lys Tyr Gly Tyr Tyr Asn Tyr						
		565		570		575
Ala Gly Tyr Ser Asn Phe Ile Val Thr Ser Asn Asp Thr Gly Gly Gly						
		580		585		590
Asp Gly Thr Val Lys Pro Glu Glu Lys Leu Tyr Lys Ile Gly Asp Tyr						
		595		600		605
Val Trp Glu Asp Val Asp Lys Asp Gly Val Gln Gly Thr Asp Ser Lys						
		610		615		620
Glu Lys Pro Met Ala Asn Val Leu Val Thr Leu Thr Tyr Pro Asp Gly						
		625		630		635
Thr Thr Lys Ser Val Arg Thr Asp Ala Asn Gly His Tyr Glu Phe Gly						
		645		650		655
Gly Leu Lys Asp Gly Glu Thr Tyr Thr Val Lys Phe Glu Thr Pro Ala						
		660		665		670
Gly Tyr Leu Pro Thr Lys Val Asn Gly Thr Thr Asp Gly Glu Lys Asp						
		675		680		685
Ser Asn Gly Ser Ser Ile Thr Val Lys Ile Asn Gly Lys Asp Asp Met						
		690		695		700
Ser Leu Asp Thr Gly Phe Tyr Lys Glu Pro Lys Tyr Asn Leu Gly Asp						
		705		710		715
Tyr Val Trp Glu Asp Thr Asn Lys Asp Gly Ile Gln Asp Ala Asn Glu						
		725		730		735
Pro Gly Ile Lys Asp Val Lys Val Thr Leu Lys Asp Ser Thr Gly Lys						
		740		745		750
Val Ile Gly Thr Thr Thr Thr Asp Ala Ser Gly Lys Tyr Lys Phe Thr						
		755		760		765
Asp Leu Asp Asn Gly Asn Tyr Thr Val Glu Phe Glu Thr Pro Ala Gly						
		770		775		780
Tyr Thr Pro Thr Val Lys Asn Thr Thr Ala Glu Asp Lys Asp Ser Asn						
		785		790		795
Gly Leu Thr Thr Thr Gly Val Ile Lys Asp Ala Asp Asn Met Thr Leu						
		805		810		815

Asp Ser Gly Phe Tyr Lys Thr Pro Lys Tyr Ser Leu Gly Asp Tyr Val
 820 825 830
 Trp Tyr Asp Ser Asn Lys Asp Gly Lys Gln Asp Ser Thr Glu Lys Gly
 835 840 845
 Ile Lys Asp Val Lys Val Thr Leu Leu Asn Glu Lys Gly Glu Val Ile
 850 855 860
 Gly Thr Thr Lys Thr Asp Glu Asn Gly Lys Tyr Arg Phe Asp Asn Leu
 865 870 875 880
 Asp Ser Gly Lys Tyr Lys Val Ile Phe Glu Lys Pro Ala Gly Leu Thr
 885 890 895
 Gln Thr Val Thr Asn Thr Thr Glu Asp Asp Lys Asp Ala Asp Gly Gly
 900 905 910
 Glu Val Asp Val Thr Ile Thr Asp His Asp Asp Phe Thr Leu Asp Asn
 915 920 925
 Gly Tyr Phe Glu Glu Asp Thr Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 930 935 940
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 945 950 955 960
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 965 970 975
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 980 985 990
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 995 1000 1005
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 1010 1015 1020
 Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 1025 1030 1035
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 1040 1045 1050
 Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 1055 1060 1065

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ala Gly
1070 1075 1080

Lys His Thr Pro Val Lys Pro Met Ser Thr Thr Lys Asp His His
1085 1090 1095

Asn Lys Ala Lys Ala Leu Pro Glu Thr Gly Ser Glu Asn Asn Gly
1100 1105 1110

Ser Asn Asn Ala Thr Leu Phe Gly Gly Leu Phe Ala Ala Leu Gly
1115 1120 1125

Ser Leu Leu Leu Phe Gly Arg Arg Lys Lys Gln Asn Lys
1130 1135 1140

<210> 15

<211> 350

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 15

5

ES 2 563 646 T3

Met	Thr	Lys	His	Tyr	Leu	Asn	Ser	Lys	Tyr	Gln	Ser	Glu	Gln	Arg	Ser
1				5					10					15	
Ser	Ala	Met	Lys	Lys	Ile	Thr	Met	Gly	Thr	Ala	Ser	Ile	Ile	Leu	Gly
			20					25					30		
Ser	Leu	Val	Tyr	Ile	Gly	Ala	Asp	Ser	Gln	Gln	Val	Asn	Ala	Ala	Thr
		35					40					45			
Glu	Ala	Thr	Asn	Ala	Thr	Asn	Asn	Gln	Ser	Thr	Gln	Val	Ser	Gln	Ala
	50					55					60				
Thr	Ser	Gln	Pro	Ile	Asn	Phe	Gln	Val	Gln	Lys	Asp	Gly	Ser	Ser	Glu
65					70					75					80
Lys	Ser	His	Met	Asp	Asp	Tyr	Met	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Val	Ile	Lys
				85					90					95	
Gln	Asn	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Phe	Gln	Thr	Val	Leu	Asn	Asn	Ala	Ser	Phe
			100					105					110		
Trp	Lys	Glu	Tyr	Lys	Phe	Tyr	Asn	Ala	Asn	Asn	Gln	Glu	Leu	Ala	Thr
		115					120					125			
Thr	Val	Val	Asn	Asp	Asn	Lys	Lys	Ala	Asp	Thr	Arg	Thr	Ile	Asn	Val
	130					135					140				
Ala	Val	Glu	Pro	Gly	Tyr	Lys	Ser	Leu	Thr	Thr	Lys	Val	His	Ile	Val

ES 2 563 646 T3

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

<210> 16
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.

<400> 16

ES 2 563 646 T3

Met Asn Lys Gln Gln Lys Glu Phe Lys Ser Phe Tyr Ser Ile Arg Lys
1 5 10 15

Ser Ser Leu Gly Val Ala Ser Val Ala Ile Ser Thr Leu Leu Leu Leu
20 25 30

ES 2 563 646 T3

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

ES 2 563 646 T3

Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Asn Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu
 290 295 300
 Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Asp Glu Gln Val Lys Ser Ala Ile Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln
 325 330 335
 Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val
 340 345 350
 Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys
 355 360 365
 His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met
 370 375 380
 Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln
 385 390 395 400
 Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile
 405 410 415
 Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys
 420 425 430
 Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile
 435 440 445
 Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys
 450 455 460
 Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr
 465 470 475 480
 Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln
 485 490 495
 Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu
 500 505 510
 Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys
 515 520 525
 Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val
 530 535 540
 Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys

545		550		555		560
Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys						
		565		570		575
Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly						
		580		585		590
His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys						
		595		600		605
Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro						
		610		615		620
Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro						
		625		630		635
Arg Lys Arg Lys Asn						
		645				

<210> 17
 <211> 80
 5 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.

<400> 17

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

<210> 18
 <211> 877
 15 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.

ES 2 563 646 T3

<400> 18

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

ES 2 563 646 T3

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

ES 2 563 646 T3

275					280					285					
Asn	Gly	Asp	Val	Val	Ala	Lys	Ala	Thr	Tyr	Asp	Ile	Leu	Thr	Lys	Thr
290						295					300				
Tyr	Thr	Phe	Val	Phe	Thr	Asp	Tyr	Val	Asn	Asn	Lys	Glu	Asn	Ile	Asn
305					310					315					320
Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Pro	Leu	Phe	Thr	Asp	Arg	Ala	Lys	Ala	Pro	Lys
				325					330					335	
Ser	Gly	Thr	Tyr	Asp	Ala	Asn	Ile	Asn	Ile	Ala	Asp	Glu	Met	Phe	Asn
			340					345					350		
Asn	Lys	Ile	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Ser	Ser	Pro	Ile	Ala	Gly	Ile	Asp	Lys
		355					360					365			
Pro	Asn	Gly	Ala	Asn	Ile	Ser	Ser	Gln	Ile	Ile	Gly	Val	Asp	Thr	Ala
	370					375					380				
Ser	Gly	Gln	Asn	Thr	Tyr	Lys	Gln	Thr	Val	Phe	Val	Asn	Pro	Lys	Gln
385					390					395					400
Arg	Val	Leu	Gly	Asn	Thr	Trp	Val	Tyr	Ile	Lys	Gly	Tyr	Gln	Asp	Lys
				405					410					415	
Ile	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Ser	Ala	Thr	Asp	Thr	Lys	Leu	Arg
			420					425					430		
Ile	Phe	Glu	Val	Asn	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ser	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Ala
		435					440					445			
Asp	Pro	Asn	Asp	Ser	Asn	Leu	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Gln	Phe	Lys	Asn
	450					455					460				
Arg	Ile	Tyr	Tyr	Glu	His	Pro	Asn	Val	Ala	Ser	Ile	Lys	Phe	Gly	Asp
465					470					475					480
Ile	Thr	Lys	Thr	Tyr	Val	Val	Leu	Val	Glu	Gly	His	Tyr	Asp	Asn	Thr
				485					490					495	
Gly	Lys	Asn	Leu	Lys	Thr	Gln	Val	Ile	Gln	Glu	Asn	Val	Asp	Pro	Val
			500					505					510		
Thr	Asn	Arg	Asp	Tyr	Ser	Ile	Phe	Gly	Trp	Asn	Asn	Glu	Asn	Val	Val
		515					520					525			
Arg	Tyr	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Asp	Gly	Asp	Ser	Ala	Val	Asn	Pro	Lys
	530					535					540				

Asp Pro Thr Pro Gly Pro Pro Val Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Pro
 545 550 555 560

 Glu Pro Glu Pro Thr Pro Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Pro Glu Pro
 565 570 575

 Glu Pro Ser Pro Asp Pro Asp Pro Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 580 585 590

 Gly Ser Asp Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser
 595 600 605

 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser
 610 615 620

 Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 625 630 635 640

 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 645 650 655

 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser
 660 665 670

 Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 675 680 685

 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 690 695 700

 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 705 710 715 720

 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 725 730 735

 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 740 745 750

 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 755 760 765

 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 770 775 780

 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 785 790 795 800

Asp Ser Asp Ser Arg Val Thr Pro Pro Asn Asn Glu Gln Lys Ala Pro
805 810 815

Ser Asn Pro Lys Gly Glu Val Asn His Ser Asn Lys Val Ser Lys Gln
820 825 830

His Lys Thr Asp Ala Leu Pro Glu Thr Gly Asp Lys Ser Glu Asn Thr
835 840 845

Asn Ala Thr Leu Phe Gly Ala Met Met Ala Leu Leu Gly Ser Leu Leu
850 855 860

Leu Phe Arg Lys Arg Lys Gln Asp His Lys Glu Lys Ala
865 870 875

<210> 19

5 <211> 227

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 19

10

Met	Lys	Asn	Ile	Leu	Lys	Val	Phe	Asn	Thr	Thr	Ile	Leu	Ala	Leu	Ile			
1				5					10					15				
Ile	Ile	Ile	Ala	Thr	Phe	Ser	Asn	Ser	Ala	Asn	Ala	Ala	Asp	Ser	Gly			
			20					25					30					
Thr	Leu	Asn	Tyr	Glu	Val	Tyr	Lys	Tyr	Asn	Thr	Asn	Asp	Thr	Ser	Ile			
		35					40					45						
Ala	Asn	Asp	Tyr	Phe	Asn	Lys	Pro	Ala	Lys	Tyr	Ile	Lys	Lys	Asn	Gly			
	50					55					60							
Lys	Leu	Tyr	Val	Gln	Ile	Thr	Val	Asn	His	Ser	His	Trp	Ile	Thr	Gly			
65					70					75					80			
Met	Ser	Ile	Glu	Gly	His	Lys	Glu	Asn	Ile	Ile	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala			
				85					90					95				
Lys	Asp	Glu	Arg	Thr	Ser	Glu	Phe	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Asn	Gly	Lys			
			100					105					110					
Ile	Asp	Gly	Lys	Ile	Asp	Val	Tyr	Ile	Asp	Glu	Lys	Val	Asn	Gly	Lys			
		115					120					125						
Pro	Phe	Lys	Tyr	Asp	His	His	Tyr	Asn	Ile	Thr	Tyr	Lys	Phe	Asn	Gly			
	130					135					140							
Pro	Thr	Asp	Val	Ala	Gly	Ala	Asn	Ala	Pro	Gly	Lys	Asp	Asp	Lys	Asn			

145		150		155		160									
Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Asp	Lys	Gly	Ser	Asp	Gly	Thr	Thr	Thr	Gly	Gln
				165					170					175	
Ser	Glu	Ser	Asn	Ser	Ser	Asn	Lys	Asp	Lys	Val	Glu	Asn	Pro	Gln	Thr
			180					185					190		
Asn	Ala	Gly	Thr	Pro	Ala	Tyr	Ile	Tyr	Ala	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Leu
		195					200					205			
Ala	Leu	Leu	Ile	Ala	Ile	Thr	Leu	Phe	Val	Arg	Lys	Lys	Ser	Lys	Gly
	210					215					220				
Asn Val Glu															
225															

<210> 20
 <211> 635
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 20

5

10

Met	Ala	Lys	Tyr	Arg	Gly	Lys	Pro	Phe	Gln	Leu	Tyr	Val	Lys	Leu	Ser	1	5	10	15
Cys	Ser	Thr	Met	Met	Ala	Ser	Ser	Ile	Ile	Leu	Thr	Asn	Ile	Leu	Pro	20	25	30	
Tyr	Asp	Ala	Gln	Ala	Ala	Ser	Glu	Lys	Asp	Thr	Glu	Ile	Ser	Lys	Glu	35	40	45	
Ile	Leu	Ser	Lys	Gln	Asp	Leu	Leu	Asp	Lys	Val	Asp	Lys	Ala	Ile	Arg	50	55	60	
Gln	Ile	Glu	Gln	Leu	Lys	Gln	Leu	Ser	Ala	Ser	Ser	Lys	Ala	His	Tyr	65	70	75	80
Lys	Ala	Gln	Leu	Asn	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Ser	Gln	Ile	Asp	Glu	Ile	85	90	95	
Ile	Lys	Arg	Ala	Asn	Glu	Leu	Asp	Ser	Lys	Glu	Asn	Lys	Ser	Ser	His	100	105	110	
Thr	Glu	Met	Asn	Gly	Gln	Ser	Asp	Ile	Asp	Ser	Lys	Leu	Asp	Gln	Leu	115	120	125	
Leu	Lys	Asp	Leu	Asn	Glu	Val	Ser	Ser	Asn	Val	Asp	Arg	Gly	Gln	Gln	130	135	140	

Ser Gly Glu Asp Asp Leu Asn Ala Met Lys Asn Asp Met Ser Gln Thr
 145 150 155 160
 Ala Thr Thr Lys Tyr Gly Glu Lys Asp Asp Lys Asn Asp Glu Ala Met
 165 170 175
 Val Asn Lys Ala Leu Glu Asp Leu Asp His Leu Asn Gln Gln Ile His
 180 185 190
 Lys Ser Lys Asp Ala Leu Lys Asp Ala Ser Lys Asp Pro Ala Val Ser
 195 200 205
 Thr Thr Asp Ser Asn His Glu Val Ala Lys Thr Pro Asn Asn Asp Gly
 210 215 220
 Ser Gly His Val Val Leu Asn Lys Phe Leu Ser Asn Glu Glu Asn Gln
 225 230 235 240
 Ser His Ser Asn Gln Leu Thr Asp Lys Leu Gln Gly Ser Asp Lys Ile
 245 250 255
 Asn His Ala Met Ile Glu Lys Leu Ala Lys Ser Asn Ala Ser Thr Gln
 260 265 270
 His Tyr Thr Tyr His Lys Leu Asn Thr Leu Gln Ser Leu Asp Gln Arg
 275 280 285
 Ile Ala Asn Thr Gln Leu Pro Lys Asn Gln Lys Ser Asp Leu Met Ser
 290 295 300
 Glu Val Asn Lys Thr Lys Glu Arg Ile Lys Ser Gln Arg Asn Ile Ile
 305 310 315 320
 Leu Glu Glu Leu Ala Arg Thr Asp Asp Lys Lys Tyr Ala Thr Gln Ser
 325 330 335
 Ile Leu Glu Ser Ile Phe Asn Lys Asp Glu Ala Asp Lys Ile Leu Lys
 340 345 350
 Asp Ile Arg Val Asp Gly Lys Thr Asp Gln Gln Ile Ala Asp Gln Ile
 355 360 365
 Thr Arg His Ile Asp Gln Leu Ser Leu Thr Thr Ser Asp Asp Leu Leu
 370 375 380
 Thr Ser Leu Ile Asp Gln Ser Gln Asp Lys Ser Leu Leu Ile Ser Gln
 385 390 395 400

ES 2 563 646 T3

Ile	Leu	Gln	Thr	Lys	Leu	Gly	Lys	Ala	Glu	Ala	Asp	Lys	Leu	Ala	Lys
				405					410					415	
Asp	Trp	Thr	Asn	Lys	Gly	Leu	Ser	Asn	Arg	Gln	Ile	Val	Asp	Gln	Leu
			420					425					430		
Lys	Lys	His	Phe	Ala	Ser	Thr	Gly	Asp	Thr	Ser	Ser	Asp	Asp	Ile	Leu
		435					440					445			
Lys	Ala	Ile	Leu	Asn	Asn	Ala	Lys	Asp	Lys	Lys	Gln	Ala	Ile	Glu	Thr
	450					455					460				
Ile	Leu	Ala	Thr	Arg	Ile	Glu	Arg	Gln	Lys	Ala	Lys	Leu	Leu	Ala	Asp
465					470					475					480
Leu	Ile	Thr	Lys	Ile	Glu	Thr	Asp	Gln	Asn	Lys	Ile	Phe	Asn	Leu	Val
			485						490					495	
Lys	Ser	Ala	Leu	Asn	Gly	Lys	Ala	Asp	Asp	Leu	Leu	Asn	Leu	Gln	Lys
			500					505					510		
Arg	Leu	Asn	Gln	Thr	Lys	Lys	Asp	Ile	Asp	Tyr	Ile	Leu	Ser	Pro	Ile
		515					520					525			
Val	Asn	Arg	Pro	Ser	Leu	Leu	Asp	Arg	Leu	Asn	Lys	Asn	Gly	Lys	Thr
	530					535					540				
Thr	Asp	Leu	Asn	Lys	Leu	Ala	Asn	Leu	Met	Asn	Gln	Gly	Ser	Asn	Leu
545					550					555					560
Leu	Asp	Ser	Ile	Pro	Asp	Ile	Pro	Thr	Pro	Lys	Pro	Glu	Lys	Thr	Leu
				565					570					575	
Thr	Leu	Gly	Lys	Gly	Asn	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Leu	Asn	Ala	Asp
			580					585					590		
Gly	Asn	Val	Ser	Leu	Pro	Lys	Ala	Gly	Glu	Thr	Ile	Lys	Glu	His	Trp
		595					600					605			
Leu	Pro	Ile	Ser	Val	Ile	Val	Gly	Ala	Met	Gly	Val	Leu	Met	Ile	Trp
	610					615					620				
Leu	Ser	Arg	Arg	Asn	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Ala					
625					630					635					

<210> 21
<211> 953
<212> PRT
5 <213> Staphylococcus sp.

<400> 21

ES 2 563 646 T3

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

ES 2 563 646 T3

Thr	Gln	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala	Gln	Gly	Asn	Ile	Ile	Ala	Lys	Gly	Ile	260	265	270
Tyr	Asp	Ser	Lys	Thr	Asn	Thr	Thr	Thr	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr	Val	275	280	285
Asp	Gln	Tyr	Thr	Asn	Val	Ser	Gly	Ser	Phe	Glu	Gln	Val	Ala	Phe	Ala	290	295	300
Lys	Arg	Glu	Asn	Ala	Thr	Thr	Asp	Lys	Thr	Ala	Tyr	Lys	Met	Glu	Val	305	310	315
Thr	Leu	Gly	Asn	Asp	Thr	Tyr	Ser	Lys	Asp	Val	Ile	Val	Asp	Tyr	Gly	325	330	335
Asn	Gln	Lys	Gly	Gln	Gln	Leu	Ile	Ser	Ser	Thr	Asn	Tyr	Ile	Asn	Asn	340	345	350
Glu	Asp	Leu	Ser	Arg	Asn	Met	Thr	Val	Tyr	Val	Asn	Gln	Pro	Lys	Lys	355	360	365
Thr	Tyr	Thr	Lys	Glu	Thr	Phe	Val	Thr	Asn	Leu	Thr	Gly	Tyr	Lys	Phe	370	375	380
Asn	Pro	Asp	Ala	Lys	Asn	Phe	Lys	Ile	Tyr	Glu	Val	Thr	Asp	Gln	Asn	385	390	395
Gln	Phe	Val	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Lys	Asp	Val	405	410	415
Thr	Gly	Gln	Phe	Asp	Val	Ile	Tyr	Ser	Asn	Asp	Asn	Lys	Thr	Ala	Thr	420	425	430
Val	Asp	Leu	Leu	Asn	Gly	Gln	Ser	Ser	Ser	Asp	Lys	Gln	Tyr	Ile	Ile	435	440	445
Gln	Gln	Val	Ala	Tyr	Pro	Asp	Asn	Ser	Ser	Thr	Asp	Asn	Gly	Lys	Ile	450	455	460
Asp	Tyr	Thr	Leu	Glu	Thr	Gln	Asn	Gly	Lys	Ser	Ser	Trp	Ser	Asn	Ser	465	470	475
Tyr	Ser	Asn	Val	Asn	Gly	Ser	Ser	Thr	Ala	Asn	Gly	Asp	Gln	Lys	Lys	485	490	495
Tyr	Asn	Leu	Gly	Asp	Tyr	Val	Trp	Glu	Asp	Thr	Asn	Lys	Asp	Gly	Lys	500	505	510

Gln Asp Ala Asn Glu Lys Gly Ile Lys Gly Val Tyr Val Ile Leu Lys
 515 520 525
 Asp Ser Asn Gly Lys Glu Leu Asp Arg Thr Thr Thr Asp Glu Asn Gly
 530 535 540
 Lys Tyr Gln Phe Thr Gly Leu Ser Asn Gly Thr Tyr Ser Val Glu Phe
 545 550 555 560
 Ser Thr Pro Ala Gly Tyr Thr Pro Thr Thr Ala Asn Ala Gly Thr Asp
 565 570 575
 Asp Ala Val Asp Ser Asp Gly Leu Thr Thr Thr Gly Val Ile Lys Asp
 580 585 590
 Ala Asp Asn Met Thr Leu Asp Ser Gly Phe Tyr Lys Thr Pro Lys Tyr
 595 600 605
 Ser Leu Gly Asp Tyr Val Trp Tyr Asp Ser Asn Lys Asp Gly Lys Gln
 610 615 620
 Asp Ser Thr Glu Lys Gly Ile Lys Gly Val Lys Val Thr Leu Gln Asn
 625 630 635 640
 Glu Lys Gly Glu Val Ile Gly Thr Thr Glu Thr Asp Glu Asn Gly Lys
 645 650 655
 Tyr Arg Phe Asp Asn Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Lys Val Ile Phe Glu
 660 665 670
 Lys Pro Ala Gly Leu Thr Gln Thr Gly Thr Asn Thr Thr Glu Asp Asp
 675 680 685
 Lys Asp Ala Asp Gly Gly Glu Val Asp Val Thr Ile Thr Asp His Asp
 690 695 700
 Asp Phe Thr Leu Asp Asn Gly Tyr Tyr Glu Glu Glu Thr Ser Asp Ser
 705 710 715 720
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 725 730 735
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 740 745 750
 Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 755 760 765
 Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser

770		775		780
Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser				
785		790		795
				800
Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser				
		805		810
				815
Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Asn Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser				
		820		825
				830
Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser				
		835		840
				845
Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser				
		850		855
				860
Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser				
		865		870
				875
				880
Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser				
		885		890
				895
His Thr Pro Thr Lys Pro Met Ser Thr Val Lys Asp Gln His Lys Thr				
		900		905
				910
Ala Lys Ala Leu Pro Glu Thr Gly Ser Glu Asn Asn Asn Ser Asn Asn				
		915		920
				925
Gly Thr Leu Phe Gly Gly Leu Phe Ala Ala Leu Gly Ser Leu Leu Leu				
		930		935
				940
Phe Gly Arg Arg Lys Lys Gln Asn Lys				
945		950		

<210> 22
 <211> 989
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 22

ES 2 563 646 T3

Met Asn Met Lys Lys Lys Glu Lys His Ala Ile Arg Lys Lys Ser Ile
1 5 10 15

Gly Val Ala Ser Val Leu Val Gly Thr Leu Ile Gly Phe Gly Leu Leu
20 25 30

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

Ser Ala Ser Asn Glu Ser Lys Ser Asn Asp Ser Ser Ser Val Ser Ala
 50 55 60

Ala Pro Lys Thr Asp Asp Thr Asn Val Ser Asp Thr Lys Thr Ser Ser
 65 70 75 80

Asn Thr Asn Asn Gly Glu Thr Ser Val Ala Gln Asn Pro Ala Gln Gln
 85 90 95

Glu Thr Thr Gln Ser Ser Ser Thr Asn Ala Thr Thr Glu Glu Thr Pro
 100 105 110

Val Thr Gly Glu Ala Thr Thr Thr Thr Thr Asn Gln Ala Asn Thr Pro
 115 120 125

Ala Thr Thr Gln Ser Ser Asn Thr Asn Ala Glu Glu Leu Val Asn Gln
 130 135 140

Thr Ser Asn Glu Thr Thr Ser Asn Asp Thr Asn Thr Val Ser Ser Val
 145 150 155 160

Asn Ser Pro Gln Asn Ser Thr Asn Ala Glu Asn Val Ser Thr Thr Gln
 165 170 175

Asp Thr Ser Thr Glu Ala Thr Pro Ser Asn Asn Glu Ser Ala Pro Gln
 180 185 190

Asn Thr Asp Ala Ser Asn Lys Asp Val Val Ser Gln Ala Val Asn Pro
 195 200 205

Ser Thr Pro Arg Met Arg Ala Phe Ser Leu Ala Ala Val Ala Ala Asp
 210 215 220

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Asp Ile Thr Asn Gln Leu Thr Asp Val Lys
 225 230 235 240

Val Thr Ile Asp Ser Gly Thr Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr
 245 250 255

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

Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val
 275 280 285

Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu
 290 295 300

ES 2 563 646 T3

Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr
305 310 315 320

Asp Tyr Val Asp Asn Lys Glu Asn Val Thr Ala Asn Ile Thr Met Pro
325 330 335

Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn Val Thr Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu
340 345 350

Thr Thr Gly Ile Gly Thr Asn Thr Ala Ser Lys Thr Val Leu Ile Asp
355 360 365

Tyr Glu Lys Tyr Gly Gln Phe His Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile
370 375 380

Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val
385 390 395 400

Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val Val Leu Pro Ala Leu Thr Gly Asn Leu
405 410 415

Ile Pro Asn Thr Lys Ser Asn Ala Leu Ile Asp Ala Lys Asn Thr Asp
420 425 430

Ile Lys Val Tyr Arg Val Asp Asn Ala Asn Asp Leu Ser Glu Ser Tyr
435 440 445

Tyr Val Asn Pro Ser Asp Phe Glu Asp Val Thr Asn Gln Val Arg Ile
450 455 460

Ser Phe Pro Asn Ala Asn Gln Tyr Lys Val Glu Phe Pro Thr Asp Asp
465 470 475 480

Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp
485 490 495

Pro Ala Ser Thr Gly Asp Leu Ala Leu Arg Ser Thr Phe Tyr Gly Tyr
500 505 510

Asp Ser Asn Phe Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala
515 520 525

Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val
530 535 540

Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu Asp
545 550 555 560

Ser Asp Ser Asp Pro Gly Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ser Asp

ES 2 563 646 T3

565				570				575			
Ser Gly	Ser Asp	Ser Gly	Ser Asp	Ser Thr	Ser Asp	Ser Gly	Ser Asp				
	580			585		590					
Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp				
	595		600			605					
Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala				
610			615			620					
Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp				
625		630			635		640				
Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp				
		645			650		655				
Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp				
		660			665		670				
Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp				
	675			680			685				
Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp				
690			695			700					
Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp				
705			710			715					
Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp				
		725			730		735				
Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp				
		740			745		750				
Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp				
	755			760			765				
Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp				
770			775			780					
Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp				
785			790			795					
Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp				
		805			810		815				
Ser Asp	Ser Asp	Ser Ala	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp	Ser Asp				
		820			825		830				

Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
835 840 845

Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
850 855 860

Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp
865 870 875 880

Ser Ala Ser Asp Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asp Ser Ser Ser Asp
885 890 895

Ser Asp Ser Asp Ser Thr Ser Asp Thr Gly Ser Asp Asn Asp Ser Asp
900 905 910

Ser Asp Ser Asn Ser Asp Ser Glu Ser Gly Ser Asn Asn Asn Val Val
915 920 925

Pro Pro Asn Ser Pro Lys Asn Gly Thr Asn Ala Ser Asn Lys Asn Glu
930 935 940

Ala Lys Asp Ser Lys Glu Pro Leu Pro Asp Thr Gly Ser Glu Asp Glu
945 950 955 960

Ala Asn Thr Ser Leu Ile Trp Gly Leu Leu Ala Ser Leu Gly Ser Leu
965 970 975

Leu Leu Phe Arg Arg Lys Lys Glu Asn Lys Asp Lys Lys
980 985

<210> 23
<211> 584
<212> PRT
<213> Staphylococcus sp.

<400> 23

ES 2 563 646 T3

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

Ala Ser Thr Gly Ala Asn Phe Asn Asn Asn Glu Ala Ser Ala Ala Ala
20 25 30

Lys Pro Leu Asp Lys Ser Ser Ser Ser Leu His His Gly Tyr Ser Lys
35 40 45

Val His Val Pro Tyr Ala Ile Thr Val Asn Gly Thr Ser Gln Asn Ile
50 55 60

ES 2 563 646 T3

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

ES 2 563 646 T3

325								330				335				
Lys	Arg	Ile	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Lys	Asn	Tyr	Thr	Ala	Asn	Leu	Val	
340								345				350				
His	Ala	Lys	Asp	Val	Lys	Arg	Ile	Glu	Ile	Thr	Val	Lys	Thr	Gly	Thr	
355								360				365				
Lys	Ala	Lys	Ala	Asp	Arg	Tyr	Val	Pro	Tyr	Thr	Ile	Ala	Val	Asn	Gly	
370								375				380				
Thr	Ser	Thr	Pro	Ile	Leu	Ser	Asp	Leu	Lys	Phe	Thr	Gly	Asp	Pro	Arg	
385								390				395				
Val	Gly	Tyr	Lys	Asp	Ile	Ser	Lys	Lys	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Lys	His	
405								410				415				
Asp	Arg	Gly	Ile	Gly	Glu	Arg	Glu	Leu	Lys	Tyr	Ala	Lys	Lys	Ala	Thr	
420								425				430				
Tyr	Thr	Val	His	Phe	Lys	Asn	Gly	Thr	Lys	Lys	Val	Ile	Asn	Ile	Asn	
435								440				445				
Ser	Asn	Ile	Ser	Gln	Leu	Asn	Leu	Leu	Tyr	Val	Gln	Asp	Ile	Lys	Lys	
450								455				460				
Ile	Asp	Ile	Asp	Val	Lys	Thr	Gly	Thr	Lys	Ala	Lys	Ala	Asp	Ser	Tyr	
465								470				475				
Val	Pro	Tyr	Thr	Ile	Ala	Val	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Pro	Ile	Leu	Ser	
485								490				495				
Lys	Leu	Lys	Ile	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Ile	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Asn	
500								505				510				
Asp	Lys	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Lys	Ser	Glu	Arg	Gly	Ile	Ser	Asp	Leu	
515								520				525				
Asp	Leu	Lys	Phe	Ala	Lys	Gln	Ala	Lys	Tyr	Thr	Val	Tyr	Phe	Lys	Asn	
530								535				540				
Gly	Lys	Lys	Gln	Val	Val	Asn	Leu	Lys	Ser	Asp	Ile	Phe	Thr	Pro	Asn	
545								550				555				
Leu	Phe	Ser	Ala	Lys	Asp	Ile	Lys	Lys	Ile	Asp	Ile	Asp	Val	Lys	Gln	
565								570				575				
Tyr	Thr	Lys	Ser	Lys	Lys	Asn	Lys									
580																

<210> 24
 <211> 10419
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.

5

<400> 24

```

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

Val Gly Thr Phe Ser Thr Val Ile Ala Thr Leu Val Phe Leu Gly Phe
      20          25          30

Asn Thr Ser Gln Ala His Ala Ala Glu Thr Asn Gln Pro Ala Ser Val
      35          40          45

Val Lys Gln Lys Gln Gln Ser Asn Asn Glu Gln Thr Glu Asn Arg Glu
      50          55          60

Ser Gln Val Gln Asn Ser Gln Asn Ser Gln Asn Gly Gln Ser Leu Ser
      65          70          75          80

Ala Thr His Glu Asn Glu Gln Pro Asn Ile Ser Gln Ala Asn Leu Val
      85          90          95

Asp Gln Lys Val Ala Gln Ser Ser Thr Thr Asn Asp Glu Gln Pro Ala
      100          105          110

Ser Gln Asn Val Asn Thr Lys Lys Asp Ser Ala Thr Ala Ala Thr Thr
      115          120          125

Gln Pro Asp Lys Glu Gln Ser Lys His Lys Gln Asn Glu Ser Gln Ser
      130          135          140

Ala Asn Lys Asn Gly Asn Asp Asn Arg Ala Ala His Val Glu Asn His
      145          150          155          160

Glu Ala Asn Val Val Thr Ala Ser Asp Ser Ser Asp Asn Gly Asn Val
      165          170          175

Gln His Asp Arg Asn Glu Leu Gln Ala Phe Phe Asp Ala Asn Tyr His
      180          185          190

Asp Tyr Arg Phe Ile Asp Arg Glu Asn Ala Asp Ser Gly Thr Phe Asn
      195          200          205

Tyr Val Lys Gly Ile Phe Asp Lys Ile Asn Thr Leu Leu Gly Ser Asn
      210          215          220
    
```

Asp Pro Ile Asn Asn Lys Asp Leu Gln Leu Ala Tyr Lys Glu Leu Glu
 225 230 235 240
 Gln Ala Val Ala Leu Ile Arg Thr Met Pro Gln Arg Gln Gln Thr Ser
 245 250 255
 Arg Arg Ser Asn Arg Ile Gln Thr Arg Ser Val Glu Ser Arg Ala Ala
 260 265 270
 Glu Pro Arg Ser Val Ser Asp Tyr Gln Asn Ala Asn Ser Ser Tyr Tyr
 275 280 285
 Val Glu Asn Ala Asn Asp Gly Ser Gly Tyr Pro Val Gly Thr Tyr Ile
 290 295 300
 Asn Ala Ser Ser Lys Gly Ala Pro Tyr Asn Leu Pro Thr Thr Pro Trp
 305 310 315 320
 Asn Thr Leu Lys Ala Ser Asp Ser Lys Glu Ile Ala Leu Met Thr Ala
 325 330 335
 Lys Gln Thr Gly Asp Gly Tyr Gln Trp Val Ile Lys Phe Asn Lys Gly
 340 345 350
 His Ala Pro His Gln Asn Met Ile Phe Trp Phe Ala Leu Pro Ala Asp
 355 360 365
 Gln Val Pro Val Gly Arg Thr Asp Phe Val Thr Val Asn Ser Asp Gly
 370 375 380
 Thr Asn Val Gln Trp Ser His Gly Ala Gly Ala Gly Ala Asn Lys Pro
 385 390 395 400
 Leu Gln Gln Met Trp Glu Tyr Gly Val Asn Asp Pro His Arg Ser His
 405 410 415
 Asp Phe Lys Ile Arg Asn Arg Ser Gly Gln Val Ile Tyr Asp Trp Pro
 420 425 430
 Thr Val His Ile Tyr Ser Leu Glu Asp Leu Ser Arg Ala Ser Asp Tyr
 435 440 445
 Phe Ser Glu Ala Gly Ala Thr Pro Ala Thr Lys Ala Phe Gly Arg Gln
 450 455 460
 Asn Phe Glu Tyr Ile Asn Gly Gln Lys Pro Ala Glu Ser Pro Gly Val
 465 470 475 480
 Pro Lys Val Tyr Thr Phe Ile Gly Gln Gly Asp Ala Ser Tyr Thr Ile

ES 2 563 646 T3

485								490				495					
Ser	Phe	Lys	Thr	Gln	Gly	Pro	Thr	Val	Asn	Lys	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Ala		
500								505				510					
Gly	Gly	Arg	Ala	Leu	Glu	Tyr	Asn	Gln	Leu	Phe	Met	Tyr	Ser	Gln	Leu		
515								520				525					
Tyr	Val	Glu	Ser	Thr	Gln	Asp	His	Gln	Gln	Arg	Leu	Asn	Gly	Leu	Arg		
530								535				540					
Gln	Val	Val	Asn	Arg	Thr	Tyr	Arg	Ile	Gly	Thr	Thr	Lys	Arg	Val	Glu		
545								550				555				560	
Val	Ser	Gln	Gly	Asn	Val	Gln	Thr	Lys	Lys	Val	Leu	Glu	Ser	Thr	Asn		
565								570				575					
Leu	Asn	Ile	Asp	Asp	Phe	Val	Asp	Asp	Pro	Leu	Ser	Tyr	Val	Lys	Thr		
580								585				590					
Pro	Ser	Asn	Lys	Val	Leu	Gly	Phe	Tyr	Ser	Asn	Asn	Ala	Asn	Thr	Asn		
595								600				605					
Ala	Phe	Arg	Pro	Gly	Gly	Ala	Gln	Gln	Leu	Asn	Glu	Tyr	Gln	Leu	Ser		
610								615				620					
Gln	Leu	Phe	Thr	Asp	Gln	Lys	Leu	Gln	Glu	Ala	Ala	Arg	Thr	Arg	Asn		
625								630				635				640	
Pro	Ile	Arg	Leu	Met	Ile	Gly	Phe	Asp	Tyr	Pro	Asp	Ala	Tyr	Gly	Asn		
645								650				655					
Ser	Glu	Thr	Leu	Val	Pro	Val	Asn	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Glu	Ile	Gln		
660								665				670					
His	Asn	Ile	Lys	Phe	Phe	Lys	Asn	Asp	Asp	Thr	Gln	Asn	Ile	Ala	Glu		
675								680				685					
Lys	Pro	Phe	Ser	Lys	Gln	Ala	Gly	His	Pro	Val	Phe	Tyr	Val	Tyr	Ala		
690								695				700					
Gly	Asn	Gln	Gly	Asn	Ala	Ser	Val	Asn	Leu	Gly	Gly	Ser	Val	Thr	Ser		
705								710				715				720	
Ile	Gln	Pro	Leu	Arg	Ile	Asn	Leu	Thr	Ser	Asn	Glu	Asn	Phe	Thr	Asp		
725								730				735					
Lys	Asp	Trp	Gln	Ile	Thr	Gly	Ile	Pro	Arg	Thr	Leu	His	Ile	Glu	Asn		
740								745				750					

ES 2 563 646 T3

Ser Thr Asn Arg Pro Asn Asn Ala Arg Glu Arg Asn Ile Glu Leu Val
755 760 765

Gly Asn Leu Leu Pro Gly Asp Tyr Phe Gly Thr Ile Arg Phe Gly Arg
770 775 780

Lys Glu Gln Leu Phe Glu Ile Arg Val Lys Pro His Thr Pro Thr Ile
785 790 795 800

Thr Thr Thr Ala Glu Gln Leu Arg Gly Thr Ala Leu Gln Lys Val Pro
805 810 815

Val Asn Ile Ser Gly Ile Pro Leu Asp Pro Ser Ala Leu Val Tyr Leu
820 825 830

Val Ala Pro Thr Asn Gln Thr Thr Asn Gly Gly Ser Glu Ala Asp Gln
835 840 845

Ile Pro Ser Gly Tyr Thr Ile Leu Ala Thr Gly Thr Pro Asp Gly Val
850 855 860

His Asn Thr Ile Thr Ile Arg Pro Gln Asp Tyr Val Val Phe Ile Pro
865 870 875 880

Pro Val Gly Lys Gln Ile Arg Ala Val Val Tyr Tyr Asn Lys Val Val
885 890 895

Ala Ser Asn Met Ser Asn Ala Val Thr Ile Leu Pro Asp Asp Ile Pro
900 905 910

Pro Thr Ile Asn Asn Pro Val Gly Ile Asn Ala Lys Tyr Tyr Arg Gly
915 920 925

Asp Glu Val Asn Phe Thr Met Gly Val Ser Asp Arg His Ser Gly Ile
930 935 940

Lys Asn Thr Thr Ile Thr Thr Leu Pro Asn Gly Trp Thr Ser Asn Leu
945 950 955 960

Thr Lys Ala Asp Lys Asn Asn Gly Ser Leu Ser Ile Thr Gly Arg Val
965 970 975

Ser Met Asn Gln Ala Phe Asn Ser Asp Ile Thr Phe Lys Val Ser Ala
980 985 990

Thr Asp Asn Val Asn Asn Thr Thr Asn Asp Ser Gln Ser Lys His Val
995 1000 1005

Ser Ile His Val Gly Lys Ile Ser Glu Asp Ala His Pro Ile Val 1010 1015 1020
Leu Gly Asn Thr Glu Lys Val Val Val Val Asn Pro Thr Ala Val 1025 1030 1035
Ser Asn Asp Glu Lys Gln Ser Ile Ile Thr Ala Phe Met Asn Lys 1040 1045 1050
Asn Gln Asn Ile Arg Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Asp Pro Val Thr 1055 1060 1065
Val Asp Asn Asn Gly Asn Val Thr Leu His Tyr Arg Asp Gly Ser 1070 1075 1080
Ser Thr Thr Leu Asp Ala Thr Asn Val Met Thr Tyr Glu Pro Val 1085 1090 1095
Val Lys Pro Glu Tyr Gln Thr Val Asn Ala Ala Lys Thr Ala Thr 1100 1105 1110
Val Thr Ile Ala Lys Gly Gln Ser Phe Ser Ile Gly Asp Ile Lys 1115 1120 1125
Gln Tyr Phe Thr Leu Ser Asn Gly Gln Pro Ile Pro Ser Gly Thr 1130 1135 1140
Phe Thr Asn Ile Thr Ser Asp Arg Thr Ile Pro Thr Ala Gln Glu 1145 1150 1155
Val Ser Gln Met Asn Ala Gly Thr Gln Leu Tyr His Ile Thr Ala 1160 1165 1170
Thr Asn Ala Tyr His Lys Asp Ser Glu Asp Phe Tyr Ile Ser Leu 1175 1180 1185
Lys Ile Ile Asp Val Lys Gln Pro Glu Gly Asp Gln Arg Val Tyr 1190 1195 1200
Arg Thr Ser Thr Tyr Asp Leu Thr Thr Asp Glu Ile Ser Lys Val 1205 1210 1215
Lys Gln Ala Phe Ile Asn Ala Asn Arg Asp Val Ile Thr Leu Ala 1220 1225 1230
Glu Gly Asp Ile Ser Val Thr Asn Thr Pro Asn Gly Ala Asn Val 1235 1240 1245

ES 2 563 646 T3

Ser Thr	Ile Thr Val Asn	Ile Asn Lys Gly Arg	Leu Thr Lys Ser
1250		1255	1260
Phe Ala	Ser Asn Leu Ala Asn	Met Asn Phe Leu Arg	Trp Val Asn
1265		1270	1275
Phe Pro	Gln Asp Tyr Thr Val	Thr Trp Thr Asn Ala	Lys Ile Ala
1280		1285	1290
Asn Arg	Pro Thr Asp Gly Gly	Leu Ser Trp Ser Asp	Asp His Lys
1295		1300	1305
Ser Leu	Ile Tyr Arg Tyr Asp	Ala Thr Leu Gly Thr	Gln Ile Thr
1310		1315	1320
Thr Asn	Asp Ile Leu Thr Met	Leu Lys Ala Thr Thr	Thr Val Pro
1325		1330	1335
Gly Leu	Arg Asn Asn Ile Thr	Gly Asn Glu Lys Ser	Gln Ala Glu
1340		1345	1350
Ala Gly	Gly Arg Pro Asn Phe	Arg Thr Thr Gly Tyr	Ser Gln Ser
1355		1360	1365
Asn Ala	Thr Thr Asp Gly Gln	Arg Gln Phe Thr Leu	Asn Gly Gln
1370		1375	1380
Val Ile	Gln Val Leu Asp Ile	Ile Asn Pro Ser Asn	Gly Tyr Gly
1385		1390	1395
Gly Gln	Pro Val Thr Asn Ser	Asn Thr Arg Ala Asn	His Ser Asn
1400		1405	1410
Ser Thr	Val Val Asn Val Asn	Glu Pro Ala Ala Asn	Gly Ala Gly
1415		1420	1425
Ala Phe	Thr Ile Asp His Val	Val Lys Ser Asn Ser	Thr His Asn
1430		1435	1440
Ala Ser	Asp Ala Val Tyr Lys	Ala Gln Leu Tyr Leu	Thr Pro Tyr
1445		1450	1455
Gly Pro	Lys Gln Tyr Val Glu	His Leu Asn Gln Asn	Thr Gly Asn
1460		1465	1470
Thr Thr	Asp Ala Ile Asn Ile	Tyr Phe Val Pro Ser	Asp Leu Val
1475		1480	1485
Asn Pro	Thr Ile Ser Val Gly	Asn Tyr Thr Asn His	Gln Val Phe

ES 2 563 646 T3

1490		1495		1500
Ser Gly Glu Thr Phe Thr Asn Thr Ile Thr Ala Asn Asp Asn Phe	1505	1510		1515
Gly Val Gln Ser Val Thr Val Pro Asn Thr Ser Gln Ile Thr Gly	1520	1525		1530
Thr Val Asp Asn Asn His Gln His Val Ser Ala Thr Ala Pro Asn	1535	1540		1545
Val Thr Ser Ala Thr Asn Lys Thr Ile Asn Leu Leu Ala Thr Asp	1550	1555		1560
Thr Ser Gly Asn Thr Ala Thr Thr Ser Phe Asn Val Thr Val Lys	1565	1570		1575
Pro Leu Arg Asp Lys Tyr Arg Val Gly Thr Ser Ser Thr Ala Ala	1580	1585		1590
Asn Pro Val Arg Ile Ala Asn Ile Ser Asn Asn Ala Thr Val Ser	1595	1600		1605
Gln Ala Asp Gln Thr Thr Ile Ile Asn Ser Leu Thr Phe Thr Glu	1610	1615		1620
Thr Val Pro Asn Arg Ser Tyr Ala Arg Ala Ser Ala Asn Glu Ile	1625	1630		1635
Thr Ser Lys Thr Val Ser Asn Val Ser Arg Thr Gly Asn Asn Ala	1640	1645		1650
Asn Val Thr Val Thr Val Thr Tyr Gln Asp Gly Thr Thr Ser Thr	1655	1660		1665
Val Thr Val Pro Val Lys His Val Ile Pro Glu Ile Val Ala His	1670	1675		1680
Ser His Tyr Thr Val Gln Gly Gln Asp Phe Pro Ala Gly Asn Gly	1685	1690		1695
Ser Ser Ala Ser Asp Tyr Phe Lys Leu Ser Asn Gly Ser Asp Ile	1700	1705		1710
Ala Asp Ala Thr Ile Thr Trp Val Ser Gly Gln Ala Pro Asn Lys	1715	1720		1725
Asp Asn Thr Arg Ile Gly Glu Asp Ile Thr Val Thr Ala His Ile	1730	1735		1740

Leu 1745	Ile	Asp	Gly	Glu	Thr	Thr	Pro	Ile	Thr	Lys	Thr	Ala	Thr	Tyr
Lys 1760	Val	Val	Arg	Thr	Val	Pro	Lys	His	Val	Phe	Glu	Thr	Ala	Arg
Gly 1775	Val	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Ser	Asp	Met	Tyr	Asp	Ala	Lys	Gln
Tyr 1790	Val	Lys	Pro	Val	Asn	Asn	Ser	Trp	Ser	Thr	Asn	Ala	Gln	His
Met 1805	Asn	Phe	Gln	Phe	Val	Gly	Thr	Tyr	Gly	Pro	Asn	Lys	Asp	Val
Val 1820	Gly	Ile	Ser	Thr	Arg	Leu	Ile	Arg	Val	Thr	Tyr	Asp	Asn	Arg
Gln 1835	Thr	Glu	Asp	Leu	Thr	Ile	Leu	Ser	Lys	Val	Lys	Pro	Asp	Pro
Pro 1850	Arg	Ile	Asp	Ala	Asn	Ser	Val	Thr	Tyr	Lys	Ala	Gly	Leu	Thr
Asn 1865	Gln	Glu	Ile	Lys	Val	Asn	Asn	Val	Leu	Asn	Asn	Ser	Ser	Val
Lys 1880	Leu	Phe	Lys	Ala	Asp	Asn	Thr	Pro	Leu	Asn	Val	Thr	Asn	Ile
Thr 1895	His	Gly	Ser	Gly	Phe	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Ser	Asp	Ala
Leu 1910	Pro	Asn	Gly	Gly	Ile	Lys	Ala	Lys	Ser	Ser	Ile	Ser	Met	Asn
Asn 1925	Val	Thr	Tyr	Thr	Thr	Gln	Asp	Glu	His	Gly	Gln	Val	Val	Thr
Val 1940	Thr	Arg	Asn	Glu	Ser	Val	Asp	Ser	Asn	Asp	Ser	Ala	Thr	Val
Thr 1955	Val	Thr	Pro	Gln	Leu	Gln	Ala	Thr	Thr	Glu	Gly	Ala	Val	Phe
Ile 1970	Lys	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Asp	Phe	Gly	His	Val	Glu	Arg	Phe

Ile	Gln	Asn	Pro	Pro	His	Gly	Ala	Thr	Val	Ala	Trp	His	Asp	Ser
1985						1990					1995			
Pro	Asp	Thr	Trp	Lys	Asn	Thr	Val	Gly	Asn	Thr	His	Lys	Thr	Ala
2000						2005					2010			
Val	Val	Thr	Leu	Pro	Asn	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Asn	Val	Glu	Val
2015						2020					2025			
Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Pro	Val	Ala	Asn	Ala	Lys	Ala	Pro	Ser	Arg
2030						2035					2040			
Asp	Val	Lys	Gly	Gln	Asn	Leu	Thr	Asn	Gly	Thr	Asp	Ala	Met	Asn
2045						2050					2055			
Tyr	Ile	Thr	Phe	Asp	Pro	Asn	Thr	Asn	Thr	Asn	Gly	Ile	Thr	Ala
2060						2065					2070			
Ala	Trp	Ala	Asn	Arg	Gln	Gln	Pro	Asn	Asn	Gln	Gln	Ala	Gly	Val
2075						2080					2085			
Gln	His	Leu	Asn	Val	Asp	Val	Thr	Tyr	Pro	Gly	Ile	Ser	Ala	Ala
2090						2095					2100			
Lys	Arg	Val	Pro	Val	Thr	Val	Asn	Val	Tyr	Gln	Phe	Glu	Phe	Pro
2105						2110					2115			
Gln	Thr	Thr	Tyr	Thr	Thr	Thr	Val	Gly	Gly	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly
2120						2125					2130			
Thr	Gln	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	His	Met	Gln	Asn	Ala	Thr	Gly	Leu
2135						2140					2145			
Pro	Thr	Asp	Gly	Phe	Thr	Tyr	Lys	Trp	Asn	Arg	Asp	Thr	Thr	Gly
2150						2155					2160			
Thr	Asn	Asp	Ala	Asn	Trp	Ser	Ala	Met	Asn	Lys	Pro	Asn	Val	Ala
2165						2170					2175			
Lys	Val	Val	Asn	Ala	Lys	Tyr	Asp	Val	Ile	Tyr	Asn	Gly	His	Thr
2180						2185					2190			
Phe	Ala	Thr	Ser	Leu	Pro	Ala	Lys	Phe	Val	Val	Lys	Asp	Val	Gln
2195						2200					2205			
Pro	Ala	Lys	Pro	Thr	Val	Thr	Glu	Thr	Ala	Ala	Gly	Ala	Ile	Thr
2210						2215					2220			

Ile	Ala	Pro	Gly	Ala	Asn	Gln	Thr	Val	Asn	Thr	His	Ala	Gly	Asn
2225						2230					2235			
Val	Thr	Thr	Tyr	Ala	Asp	Lys	Leu	Val	Ile	Lys	Arg	Asn	Gly	Asn
2240						2245					2250			
Val	Val	Thr	Thr	Phe	Thr	Arg	Arg	Asn	Asn	Thr	Ser	Pro	Trp	Val
2255						2260					2265			
Lys	Glu	Ala	Ser	Ala	Ala	Thr	Val	Ala	Gly	Ile	Ala	Gly	Thr	Asn
2270						2275					2280			
Asn	Gly	Ile	Thr	Val	Ala	Ala	Gly	Thr	Phe	Asn	Pro	Ala	Asp	Thr
2285						2290					2295			
Ile	Gln	Val	Val	Ala	Thr	Gln	Gly	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Ser	Asp
2300						2305					2310			
Glu	Gln	Arg	Ser	Asp	Asp	Phe	Thr	Val	Val	Ala	Pro	Gln	Pro	Asn
2315						2320					2325			
Gln	Ala	Thr	Thr	Lys	Ile	Trp	Gln	Asn	Gly	His	Ile	Asp	Ile	Thr
2330						2335					2340			
Pro	Asn	Asn	Pro	Ser	Gly	His	Leu	Ile	Asn	Pro	Thr	Gln	Ala	Met
2345						2350					2355			
Asp	Ile	Ala	Tyr	Thr	Glu	Lys	Val	Gly	Asn	Gly	Ala	Glu	His	Ser
2360						2365					2370			
Lys	Thr	Ile	Asn	Val	Val	Arg	Gly	Gln	Asn	Asn	Gln	Trp	Thr	Ile
2375						2380					2385			
Ala	Asn	Lys	Pro	Asp	Tyr	Val	Thr	Leu	Asp	Ala	Gln	Thr	Gly	Lys
2390						2395					2400			
Val	Thr	Phe	Asn	Ala	Asn	Thr	Ile	Lys	Pro	Asn	Ser	Ser	Ile	Thr
2405						2410					2415			
Ile	Thr	Pro	Lys	Ala	Gly	Thr	Gly	His	Ser	Val	Ser	Ser	Asn	Pro
2420						2425					2430			
Ser	Thr	Leu	Thr	Ala	Pro	Ala	Ala	His	Thr	Val	Asn	Thr	Thr	Glu
2435						2440					2445			
Ile	Val	Lys	Asp	Tyr	Gly	Ser	Asn	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	Ile	Asn
2450						2455					2460			
Asn	Ala	Val	Gln	Val	Ala	Asn	Lys	Arg	Thr	Ala	Thr	Ile	Lys	Asn

2465	2470	2475
Gly Thr Ala Met Pro Thr Asn Leu Ala Gly Gly Ser Thr Thr Thr 2480 2485 2490		
Ile Pro Val Thr Val Thr Tyr Asn Asp Gly Ser Thr Glu Glu Val 2495 2500 2505		
Gln Glu Ser Ile Phe Thr Lys Ala Asp Lys Arg Glu Leu Ile Thr 2510 2515 2520		
Ala Lys Asn His Leu Asp Asp Pro Val Ser Thr Glu Gly Lys Lys 2525 2530 2535		
Pro Gly Thr Ile Thr Gln Tyr Asn Asn Ala Met His Asn Ala Gln 2540 2545 2550		
Gln Gln Ile Asn Thr Ala Lys Thr Glu Ala Gln Gln Val Ile Asn 2555 2560 2565		
Asn Glu Arg Ala Thr Pro Gln Gln Val Ser Asp Ala Leu Thr Lys 2570 2575 2580		
Val Arg Ala Ala Gln Thr Lys Ile Asp Gln Ala Lys Ala Leu Leu 2585 2590 2595		
Gln Asn Lys Glu Asp Asn Ser Gln Leu Val Thr Ser Lys Asn Asn 2600 2605 2610		
Leu Gln Ser Ser Val Asn Gln Val Pro Ser Thr Ala Gly Met Thr 2615 2620 2625		
Gln Gln Ser Ile Asp Asn Tyr Asn Ala Lys Lys Arg Glu Ala Glu 2630 2635 2640		
Thr Glu Ile Thr Ala Ala Gln Arg Val Ile Asp Asn Gly Asp Ala 2645 2650 2655		
Thr Ala Gln Gln Ile Ser Asp Glu Lys His Arg Val Asp Asn Ala 2660 2665 2670		
Leu Thr Ala Leu Asn Gln Ala Lys His Asp Leu Thr Ala Asp Thr 2675 2680 2685		
His Ala Leu Glu Gln Ala Val Gln Gln Leu Asn Arg Thr Gly Thr 2690 2695 2700		
Thr Thr Gly Lys Lys Pro Ala Ser Ile Thr Ala Tyr Asn Asn Ser 2705 2710 2715		

Ile Arg 2720	Ala Leu Gln Ser Asp 2725	Leu Thr Ser Ala Lys 2730	Asn Ser Ala
Asn Ala 2735	Ile Ile Gln Lys Pro 2740	Ile Arg Thr Val Gln 2745	Glu Val Gln
Ser Ala 2750	Leu Thr Asn Val Asn 2755	Arg Val Asn Glu Arg 2760	Leu Thr Gln
Ala Ile 2765	Asn Gln Leu Val Pro 2770	Leu Ala Asp Asn Ser 2775	Ala Leu Lys
Thr Ala 2780	Lys Thr Lys Leu Asp 2785	Glu Glu Ile Asn Lys 2790	Ser Val Thr
Thr Asp 2795	Gly Met Thr Gln Ser 2800	Ser Ile Gln Ala Tyr 2805	Glu Asn Ala
Lys Arg 2810	Ala Gly Gln Thr Glu 2815	Ser Thr Asn Ala Gln 2820	Asn Val Ile
Asn Asn 2825	Gly Asp Ala Thr Asp 2830	Gln Gln Ile Ala Ala 2835	Glu Lys Thr
Lys Val 2840	Glu Glu Lys Tyr Asn 2845	Ser Leu Lys Gln Ala 2850	Ile Ala Gly
Leu Thr 2855	Pro Asp Leu Ala Pro 2860	Leu Gln Thr Ala Lys 2865	Thr Gln Leu
Gln Asn 2870	Asp Ile Asp Gln Pro 2875	Thr Ser Thr Thr Gly 2880	Met Thr Ser
Ala Ser 2885	Ile Ala Ala Phe Asn 2890	Glu Lys Leu Ser Ala 2895	Ala Arg Thr
Lys Ile 2900	Gln Glu Ile Asp Arg 2905	Val Leu Ala Ser His 2910	Pro Asp Val
Ala Thr 2915	Ile Arg Gln Asn Val 2920	Thr Ala Ala Asn Ala 2925	Ala Lys Ser
Ala Leu 2930	Asp Gln Ala Arg Asn 2935	Gly Leu Thr Val Asp 2940	Lys Ala Pro
Leu Glu 2945	Asn Ala Lys Asn Gln 2950	Leu Gln His Ser Ile 2955	Asp Thr Gln

Thr 2960	Ser	Thr	Thr	Gly	Met	Thr 2965	Gln	Asp	Ser	Ile	Asn 2970	Ala	Tyr	Asn
Ala 2975	Lys	Leu	Thr	Ala	Ala	Arg 2980	Asn	Lys	Ile	Gln	Gln 2985	Ile	Asn	Gln
Val 2990	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr 2995	Val	Glu	Gln	Ile	Asn 3000	Thr	Asn	Thr
Ser 3005	Thr	Ala	Asn	Gln	Ala	Lys 3010	Ser	Asp	Leu	Asp	His 3015	Ala	Arg	Gln
Ala 3020	Leu	Thr	Pro	Asp	Lys	Ala 3025	Pro	Leu	Gln	Thr	Ala 3030	Lys	Thr	Gln
Leu 3035	Glu	Gln	Ser	Ile	Asn	Gln 3040	Pro	Thr	Asp	Thr	Thr 3045	Gly	Met	Thr
Thr 3050	Ala	Ser	Leu	Asn	Ala	Tyr 3055	Asn	Gln	Lys	Leu	Gln 3060	Ala	Ala	Arg
Gln 3065	Lys	Leu	Thr	Glu	Ile	Asn 3070	Gln	Val	Leu	Asn	Gly 3075	Asn	Pro	Thr
Val 3080	Gln	Asn	Ile	Asn	Asp	Lys 3085	Val	Thr	Glu	Ala	Asn 3090	Gln	Ala	Lys
Asp 3095	Gln	Leu	Asn	Thr	Ala	Arg 3100	Gln	Gly	Leu	Thr	Leu 3105	Asp	Arg	Gln
Pro 3110	Ala	Leu	Thr	Thr	Leu	His 3115	Gly	Ala	Ser	Asn	Leu 3120	Asn	Gln	Ala
Gln 3125	Gln	Asn	Asn	Phe	Thr	Gln 3130	Gln	Ile	Asn	Ala	Ala 3135	Gln	Asn	His
Ala 3140	Ala	Leu	Glu	Thr	Ile	Lys 3145	Ser	Asn	Ile	Thr	Ala 3150	Leu	Asn	Thr
Ala 3155	Met	Thr	Lys	Leu	Lys	Asp 3160	Ser	Val	Ala	Asp	Asn 3165	Asn	Thr	Ile
Lys 3170	Ser	Asp	Gln	Asn	Tyr	Thr 3175	Asp	Ala	Thr	Pro	Ala 3180	Asn	Lys	Gln
Ala 3185	Tyr	Asp	Asn	Ala	Val	Asn 3190	Ala	Ala	Lys	Gly	Val 3195	Ile	Gly	Glu

Thr	Thr	Asn	Pro	Thr	Met	Asp	Val	Asn	Thr	Val	Asn	Gln	Lys	Ala
3200						3205					3210			
Ala	Ser	Val	Lys	Ser	Thr	Lys	Asp	Ala	Leu	Asp	Gly	Gln	Gln	Asn
3215						3220					3225			
Leu	Gln	Arg	Ala	Lys	Thr	Glu	Ala	Thr	Asn	Ala	Ile	Thr	His	Ala
3230						3235					3240			
Ser	Asp	Leu	Asn	Gln	Ala	Gln	Lys	Asn	Ala	Leu	Thr	Gln	Gln	Val
3245						3250					3255			
Asn	Ser	Ala	Gln	Asn	Val	Gln	Ala	Val	Asn	Asp	Ile	Lys	Gln	Thr
3260						3265					3270			
Thr	Gln	Ser	Leu	Asn	Thr	Ala	Met	Thr	Gly	Leu	Lys	Arg	Gly	Val
3275						3280					3285			
Ala	Asn	His	Asn	Gln	Val	Val	Gln	Ser	Asp	Asn	Tyr	Val	Asn	Ala
3290						3295					3300			
Asp	Thr	Asn	Lys	Lys	Asn	Asp	Tyr	Asn	Asn	Ala	Tyr	Asn	His	Ala
3305						3310					3315			
Asn	Asp	Ile	Ile	Asn	Gly	Asn	Ala	Gln	His	Pro	Val	Ile	Thr	Pro
3320						3325					3330			
Ser	Asp	Val	Asn	Asn	Ala	Leu	Ser	Asn	Val	Thr	Ser	Lys	Glu	His
3335						3340					3345			
Ala	Leu	Asn	Gly	Glu	Ala	Lys	Leu	Asn	Ala	Ala	Lys	Gln	Glu	Ala
3350						3355					3360			
Asn	Thr	Ala	Leu	Gly	His	Leu	Asn	Asn	Leu	Asn	Asn	Ala	Gln	Arg
3365						3370					3375			
Gln	Asn	Leu	Gln	Ser	Gln	Ile	Asn	Gly	Ala	His	Gln	Ile	Asp	Ala
3380						3385					3390			
Val	Asn	Thr	Ile	Lys	Gln	Asn	Ala	Thr	Asn	Leu	Asn	Ser	Ala	Met
3395						3400					3405			
Gly	Asn	Leu	Arg	Gln	Ala	Val	Ala	Asp	Lys	Asp	Gln	Val	Lys	Arg
3410						3415					3420			
Thr	Glu	Asp	Tyr	Ala	Asp	Ala	Asp	Thr	Ala	Lys	Gln	Asn	Ala	Tyr
3425						3430					3435			
Asn	Ser	Ala	Val	Ser	Ser	Ala	Glu	Thr	Ile	Ile	Asn	Gln	Thr	Thr

ES 2 563 646 T3

3440	3445	3450
Asn Pro Thr Met Ser Val 3455	Asp Asp Val Asn Arg 3460	Ala Thr Ser Ala 3465
Val Thr Ser Asn Lys Asn 3470	Ala Leu Asn Gly Tyr 3475	Glu Lys Leu Ala 3480
Gln Ser Lys Thr Asp Ala 3485	Ala Arg Ala Ile Asp 3490	Ala Leu Pro His 3495
Leu Asn Asn Ala Gln Lys 3500	Ala Asp Val Lys Ser 3505	Lys Ile Asn Ala 3510
Ala Ser Asn Ile Ala Gly 3515	Val Asn Thr Val Lys 3520	Gln Gln Gly Thr 3525
Asp Leu Asn Thr Ala Met 3530	Gly Asn Leu Gln Gly 3535	Ala Ile Asn Asp 3540
Glu Gln Thr Thr Leu Asn 3545	Ser Gln Asn Tyr Gln 3550	Asp Ala Thr Pro 3555
Ser Lys Lys Thr Ala Tyr 3560	Thr Asn Ala Val Gln 3565	Ala Ala Lys Asp 3570
Ile Leu Asn Lys Ser Asn 3575	Gly Gln Asn Lys Thr 3580	Lys Asp Gln Val 3585
Thr Glu Ala Met Asn Gln 3590	Val Asn Ser Ala Lys 3595	Asn Asn Leu Asp 3600
Gly Thr Arg Leu Leu Asp 3605	Gln Ala Lys Gln Thr 3610	Ala Lys Gln Gln 3615
Leu Asn Asn Met Thr His 3620	Leu Thr Thr Ala Gln 3625	Lys Thr Asn Leu 3630
Thr Asn Gln Ile Asn Ser 3635	Gly Thr Thr Val Ala 3640	Gly Val Gln Thr 3645
Val Gln Ser Asn Ala Asn 3650	Thr Leu Asp Gln Ala 3655	Met Asn Thr Leu 3660
Arg Gln Ser Ile Ala Asn 3665	Lys Asp Ala Thr Lys 3670	Ala Ser Glu Asp 3675
Tyr Val Asp Ala Asn Asn 3680	Asp Lys Gln Thr Ala 3685	Tyr Asn Asn Ala 3690

Val	Ala	Ala	Ala	Glu	Thr	Ile	Ile	Asn	Ala	Asn	Ser	Asn	Pro	Glu
3695						3700					3705			
Met	Asn	Pro	Ser	Thr	Ile	Thr	Gln	Lys	Ala	Glu	Gln	Val	Asn	Ser
3710						3715					3720			
Ser	Lys	Thr	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Glu	Asn	Leu	Ala	Ala	Ala	Lys
3725						3730					3735			
Gln	Asn	Ala	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Thr	Leu	Thr	Ser	Ile	Thr	Asp
3740						3745					3750			
Ala	Gln	Lys	Asn	Asn	Leu	Ile	Ser	Gln	Ile	Thr	Ser	Ala	Thr	Arg
3755						3760					3765			
Val	Ser	Gly	Val	Asp	Thr	Val	Lys	Gln	Asn	Ala	Gln	His	Leu	Asp
3770						3775					3780			
Gln	Ala	Met	Ala	Ser	Leu	Gln	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Glu	Ser	Gln
3785						3790					3795			
Val	Lys	Ser	Ser	Glu	Lys	Tyr	Arg	Asp	Ala	Asp	Thr	Asn	Lys	Gln
3800						3805					3810			
Gln	Glu	Tyr	Asp	Asn	Ala	Ile	Thr	Ala	Ala	Lys	Ala	Ile	Leu	Asn
3815						3820					3825			
Lys	Ser	Thr	Gly	Pro	Asn	Thr	Ala	Gln	Asn	Ala	Val	Glu	Ala	Ala
3830						3835					3840			
Leu	Gln	Arg	Val	Asn	Asn	Ala	Lys	Asp	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Ala
3845						3850					3855			
Lys	Leu	Ile	Ala	Ala	Gln	Asn	Ala	Ala	Lys	Gln	His	Leu	Gly	Thr
3860						3865					3870			
Leu	Thr	His	Ile	Thr	Thr	Ala	Gln	Arg	Asn	Asp	Leu	Thr	Asn	Gln
3875						3880					3885			
Ile	Ser	Gln	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Gly	Val	Glu	Ser	Val	Lys	Gln
3890						3895					3900			
Asn	Ala	Asn	Ser	Leu	Asp	Gly	Ala	Met	Gly	Asn	Leu	Gln	Thr	Ala
3905						3910					3915			
Ile	Asn	Asp	Lys	Ser	Gly	Thr	Leu	Ala	Ser	Gln	Asn	Phe	Leu	Asp
3920						3925					3930			

Ala Asp 3935	Glu Gln Lys Arg	Asn 3940	Ala Tyr Asn Gln	Ala Val Ser Ala 3945
Ala Glu 3950	Thr Ile Leu Asn	Lys 3955	Gln Thr Gly Pro	Asn Thr Ala Lys 3960
Thr Ala 3965	Val Glu Gln Ala	Leu 3970	Asn Asn Val Asn	Asn Ala Lys His 3975
Ala Leu 3980	Asn Gly Thr Gln	Asn 3985	Leu Asn Asn Ala	Lys Gln Ala Ala 3990
Ile Thr 3995	Ala Ile Asn Gly	Ala 4000	Ser Asp Leu Asn	Gln Lys Gln Lys 4005
Asp Ala 4010	Leu Lys Ala Gln	Ala 4015	Asn Gly Ala Gln	Arg Val Ser Asn 4020
Ala Gln 4025	Asp Val Gln His	Asn 4030	Ala Thr Glu Leu	Asn Thr Ala Met 4035
Gly Thr 4040	Leu Lys His Ala	Ile 4045	Ala Asp Lys Thr	Asn Thr Leu Ala 4050
Ser Ser 4055	Lys Tyr Val Asn	Ala 4060	Asp Ser Thr Lys	Gln Asn Ala Tyr 4065
Thr Thr 4070	Lys Val Thr Asn	Ala 4075	Glu His Ile Ile	Ser Gly Thr Pro 4080
Thr Val 4085	Val Thr Thr Pro	Ser 4090	Glu Val Thr Ala	Ala Ala Asn Gln 4095
Val Asn 4100	Ser Ala Lys Gln	Glu 4105	Leu Asn Gly Asp	Glu Arg Leu Arg 4110
Glu Ala 4115	Lys Gln Asn Ala	Asn 4120	Thr Ala Ile Asp	Ala Leu Thr Gln 4125
Leu Asn 4130	Thr Pro Gln Lys	Ala 4135	Lys Leu Lys Glu	Gln Val Gly Gln 4140
Ala Asn 4145	Arg Leu Glu Asp	Val 4150	Gln Thr Val Gln	Thr Asn Gly Gln 4155
Ala Leu 4160	Asn Asn Ala Met	Lys 4165	Gly Leu Arg Asp	Ser Ile Ala Asn 4170

Glu	Thr	Thr	Val	Lys	Thr	Ser	Gln	Asn	Tyr	Thr	Asp	Ala	Ser	Pro
4175						4180					4185			
Asn	Asn	Gln	Ser	Thr	Tyr	Asn	Ser	Ala	Val	Ser	Asn	Ala	Lys	Gly
4190						4195					4200			
Ile	Ile	Asn	Gln	Thr	Asn	Asn	Pro	Thr	Met	Asp	Thr	Ser	Ala	Ile
4205						4210					4215			
Thr	Gln	Ala	Thr	Thr	Gln	Val	Asn	Asn	Ala	Lys	Asn	Gly	Leu	Asn
4220						4225					4230			
Gly	Ala	Glu	Asn	Leu	Arg	Asn	Ala	Gln	Asn	Thr	Ala	Lys	Gln	Asn
4235						4240					4245			
Leu	Asn	Thr	Leu	Ser	His	Leu	Thr	Asn	Asn	Gln	Lys	Ser	Ala	Ile
4250						4255					4260			
Ser	Ser	Gln	Ile	Asp	Arg	Ala	Gly	His	Val	Ser	Glu	Val	Thr	Ala
4265						4270					4275			
Thr	Lys	Asn	Ala	Ala	Thr	Glu	Leu	Asn	Thr	Gln	Met	Gly	Asn	Leu
4280						4285					4290			
Glu	Gln	Ala	Ile	His	Asp	Gln	Asn	Thr	Val	Lys	Gln	Ser	Val	Lys
4295						4300					4305			
Phe	Thr	Asp	Ala	Asp	Lys	Ala	Lys	Arg	Asp	Ala	Tyr	Thr	Asn	Ala
4310						4315					4320			
Val	Ser	Arg	Ala	Glu	Ala	Ile	Leu	Asn	Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Asn
4325						4330					4335			
Thr	Ser	Lys	Gln	Asp	Val	Glu	Ala	Ala	Ile	Gln	Asn	Val	Ser	Ser
4340						4345					4350			
Ala	Lys	Asn	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Gln	Asn	Val	Thr	Asn	Ala	Lys
4355						4360					4365			
Asn	Ala	Ala	Lys	Asn	Ala	Leu	Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Ile	Asn	Asn
4370						4375					4380			
Ala	Gln	Lys	Arg	Asp	Leu	Thr	Thr	Lys	Ile	Asp	Gln	Ala	Thr	Thr
4385						4390					4395			
Val	Ala	Gly	Val	Glu	Ala	Val	Ser	Asn	Thr	Ser	Thr	Gln	Leu	Asn
4400						4405					4410			
Thr	Ala	Met	Ala	Asn	Leu	Gln	Asn	Gly	Ile	Asn	Asp	Lys	Thr	Asn

4415	4420	4425
Thr Leu Ala Ser Glu Asn Tyr	His Asp Ala Asp Ser	Asp Lys Lys
4430	4435	4440
Thr Ala Tyr Thr Gln Ala Val	Thr Asn Ala Glu Asn	Ile Leu Asn
4445	4450	4455
Lys Asn Ser Gly Ser Asn Leu	Asp Lys Thr Ala Val	Glu Asn Ala
4460	4465	4470
Leu Ser Gln Val Ala Asn Ala	Lys Gly Ala Leu Asn	Gly Asn His
4475	4480	4485
Asn Leu Glu Gln Ala Lys Ser	Asn Ala Asn Thr Thr	Ile Asn Gly
4490	4495	4500
Leu Gln His Leu Thr Thr Ala	Gln Lys Asp Lys Leu	Lys Gln Gln
4505	4510	4515
Val Gln Gln Ala Gln Asn Val	Ala Gly Val Asp Thr	Val Lys Ser
4520	4525	4530
Ser Ala Asn Thr Leu Asn Gly	Ala Met Gly Thr Leu	Arg Asn Ser
4535	4540	4545
Ile Gln Asp Asn Thr Ala Thr	Lys Asn Gly Gln Asn	Tyr Leu Asp
4550	4555	4560
Ala Thr Glu Arg Asn Lys Thr	Asn Tyr Asn Asn Ala	Val Asp Ser
4565	4570	4575
Ala Asn Gly Val Ile Asn Ala	Thr Ser Asn Pro Asn	Met Asp Ala
4580	4585	4590
Asn Ala Ile Asn Gln Ile Ala	Thr Gln Val Thr Ser	Thr Lys Asn
4595	4600	4605
Ala Leu Asp Gly Thr His Asn	Leu Thr Gln Ala Lys	Gln Thr Ala
4610	4615	4620
Thr Asn Ala Ile Asp Gly Ala	Thr Asn Leu Asn Lys	Ala Gln Lys
4625	4630	4635
Asp Ala Leu Lys Ala Gln Val	Thr Ser Ala Gln Arg	Val Ala Asn
4640	4645	4650
Val Thr Ser Ile Gln Gln Thr	Ala Asn Glu Leu Asn	Thr Ala Met
4655	4660	4665

Gly	Gln	Leu	Gln	His	Gly	Ile	Asp	Asp	Glu	Asn	Ala	Thr	Lys	Gln
4670						4675					4680			
Thr	Gln	Lys	Tyr	Arg	Asp	Ala	Glu	Gln	Ser	Lys	Lys	Thr	Ala	Tyr
4685						4690					4695			
Asp	Gln	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Ile	Leu	Asn	Lys	Gln	Thr
4700						4705					4710			
Gly	Ser	Asn	Ser	Asp	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Arg	Ala	Leu	Gln	Gln
4715						4720					4725			
Val	Thr	Ser	Thr	Lys	Asp	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Ala	Lys	Leu	Ala
4730						4735					4740			
Glu	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Gln	Asn	Leu	Gly	Thr	Leu	Asn	His
4745						4750					4755			
Ile	Thr	Asn	Ala	Gln	Arg	Thr	Asp	Leu	Glu	Gly	Gln	Ile	Asn	Gln
4760						4765					4770			
Ala	Thr	Thr	Val	Asp	Gly	Val	Asn	Thr	Val	Lys	Thr	Asn	Ala	Asn
4775						4780					4785			
Thr	Leu	Asp	Gly	Ala	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	Gly	Ser	Ile	Asn	Asp
4790						4795					4800			
Lys	Asp	Ala	Thr	Leu	Arg	Asn	Gln	Asn	Tyr	Leu	Asp	Ala	Asp	Glu
4805						4810					4815			
Ser	Lys	Arg	Asn	Ala	Tyr	Thr	Gln	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	Gly
4820						4825					4830			
Ile	Leu	Asn	Lys	Gln	Thr	Gly	Gly	Asn	Thr	Ser	Lys	Ala	Asp	Val
4835						4840					4845			
Asp	Asn	Ala	Leu	Asn	Ala	Val	Thr	Arg	Ala	Lys	Ala	Ala	Leu	Asn
4850						4855					4860			
Gly	Ala	Asp	Asn	Leu	Arg	Asn	Ala	Lys	Thr	Ser	Ala	Thr	Asn	Thr
4865						4870					4875			
Ile	Asp	Gly	Leu	Pro	Asn	Leu	Thr	Gln	Leu	Gln	Lys	Asp	Asn	Leu
4880						4885					4890			
Lys	His	Gln	Val	Glu	Gln	Ala	Gln	Asn	Val	Ala	Gly	Val	Asn	Gly
4895						4900					4905			

Val	Lys	Asp	Lys	Gly	Asn	Thr	Leu	Asn	Thr	Ala	Met	Gly	Ala	Leu
4910						4915					4920			
Arg	Thr	Ser	Ile	Gln	Asn	Asp	Asn	Thr	Thr	Lys	Thr	Ser	Gln	Asn
4925						4930					4935			
Tyr	Leu	Asp	Ala	Ser	Asp	Ser	Asn	Lys	Asn	Asn	Tyr	Asn	Thr	Ala
4940						4945					4950			
Val	Asn	Asn	Ala	Asn	Gly	Val	Ile	Asn	Ala	Thr	Asn	Asn	Pro	Asn
4955						4960					4965			
Met	Asp	Ala	Asn	Ala	Ile	Asn	Gly	Met	Ala	Asn	Gln	Val	Asn	Thr
4970						4975					4980			
Thr	Lys	Ala	Ala	Leu	Asn	Gly	Ala	Gln	Asn	Leu	Ala	Gln	Ala	Lys
4985						4990					4995			
Thr	Asn	Ala	Thr	Asn	Thr	Ile	Asn	Asn	Ala	His	Asp	Leu	Asn	Gln
5000						5005					5010			
Lys	Gln	Lys	Asp	Ala	Leu	Lys	Thr	Gln	Val	Asn	Asn	Ala	Gln	Arg
5015						5020					5025			
Val	Ser	Asp	Ala	Asn	Asn	Val	Gln	His	Thr	Ala	Thr	Glu	Leu	Asn
5030						5035					5040			
Ser	Ala	Met	Thr	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Ile	Ala	Asp	Lys	Glu	Arg
5045						5050					5055			
Thr	Lys	Ala	Ser	Gly	Asn	Tyr	Val	Asn	Ala	Asp	Gln	Glu	Lys	Arg
5060						5065					5070			
Gln	Ala	Tyr	Asp	Ser	Lys	Val	Thr	Asn	Ala	Glu	Asn	Ile	Ile	Ser
5075						5080					5085			
Gly	Thr	Pro	Asn	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asn	Asp	Val	Asn	Ser	Ala
5090						5095					5100			
Ala	Ser	Gln	Val	Asn	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Asn
5105						5110					5115			
Asn	Leu	Arg	Val	Ala	Lys	Glu	His	Ala	Asn	Asn	Thr	Ile	Asp	Gly
5120						5125					5130			
Leu	Ala	Gln	Leu	Asn	Asn	Ala	Gln	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Gln
5135						5140					5145			

ES 2 563 646 T3

Val	Gln	Ser	Ala	Thr	Thr	Leu	Asp	Gly	Val	Gln	Thr	Val	Lys	Asn
5150						5155					5160			
Ser	Ser	Gln	Thr	Leu	Asn	Thr	Ala	Met	Lys	Gly	Leu	Arg	Asp	Ser
5165						5170					5175			
Ile	Ala	Asn	Glu	Ala	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	Gln	Asn	Tyr	Thr	Asp
5180						5185					5190			
Ala	Ser	Pro	Asn	Asn	Arg	Asn	Glu	Tyr	Asp	Ser	Ala	Val	Thr	Ala
5195						5200					5205			
Ala	Lys	Ala	Ile	Ile	Asn	Gln	Thr	Ser	Asn	Pro	Thr	Met	Glu	Pro
5210						5215					5220			
Asn	Thr	Ile	Thr	Gln	Val	Thr	Ser	Gln	Val	Thr	Thr	Lys	Glu	Gln
5225						5230					5235			
Ala	Leu	Asn	Gly	Ala	Arg	Asn	Leu	Ala	Gln	Ala	Lys	Thr	Thr	Ala
5240						5245					5250			
Lys	Asn	Asn	Leu	Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Ile	Asn	Asn	Ala	Gln	Lys
5255						5260					5265			
Asp	Ala	Leu	Thr	Arg	Ser	Ile	Asp	Gly	Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Gly
5270						5275					5280			
Val	Asn	Gln	Glu	Thr	Ala	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Asn	Asn	Ala	Met
5285						5290					5295			
His	Ser	Leu	Gln	Asn	Gly	Ile	Asn	Asp	Glu	Thr	Gln	Thr	Lys	Gln
5300						5305					5310			
Thr	Gln	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ala	Glu	Pro	Ser	Lys	Lys	Ser	Ala	Tyr
5315						5320					5325			
Asp	Gln	Ala	Val	Asn	Ala	Ala	Lys	Ala	Ile	Leu	Thr	Lys	Ala	Ser
5330						5335					5340			
Gly	Gln	Asn	Val	Asp	Lys	Ala	Ala	Val	Glu	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn
5345						5350					5355			
Val	Asn	Ser	Thr	Lys	Thr	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Ala	Lys	Leu	Asn
5360						5365					5370			
Glu	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Lys	Gln	Thr	Leu	Gly	Thr	Leu	Thr	His
5375						5380					5385			
Ile	Asn	Asn	Ala	Gln	Arg	Thr	Ala	Leu	Asp	Asn	Glu	Ile	Thr	Gln

ES 2 563 646 T3

5390	5395	5400
Ala Thr Asn Val Glu Gly Val	Asn Thr Val Lys	Ala Lys Ala Gln
5405	5410	5415
Gln Leu Asp Gly Ala Met Gly	Gln Leu Glu Thr Ser	Ile Arg Asp
5420	5425	5430
Lys Asp Thr Thr Leu Gln Ser	Gln Asn Tyr Gln Asp	Ala Asp Asp
5435	5440	5445
Ala Lys Arg Thr Ala Tyr Ser	Gln Ala Val Asn Ala	Ala Ala Thr
5450	5455	5460
Ile Leu Asn Lys Thr Ala Gly	Gly Asn Thr Pro Lys	Ala Asp Val
5465	5470	5475
Glu Arg Ala Met Gln Ala Val	Thr Gln Ala Asn Thr	Ala Leu Asn
5480	5485	5490
Gly Ile Gln Asn Leu Asp Arg	Ala Lys Gln Ala Ala	Asn Thr Ala
5495	5500	5505
Ile Thr Asn Ala Ser Asp Leu	Asn Thr Lys Gln Lys	Glu Ala Leu
5510	5515	5520
Lys Ala Gln Val Thr Ser Ala	Gly Arg Val Ser Ala	Ala Asn Gly
5525	5530	5535
Val Glu His Thr Ala Thr Glu	Leu Asn Thr Ala Met	Thr Ala Leu
5540	5545	5550
Lys Arg Ala Ile Ala Asp Lys	Ala Glu Thr Lys Ala	Ser Gly Asn
5555	5560	5565
Tyr Val Asn Ala Asp Ala Asn	Lys Arg Gln Ala Tyr	Asp Glu Lys
5570	5575	5580
Val Thr Ala Ala Glu Asn Ile	Val Ser Gly Thr Pro	Thr Pro Thr
5585	5590	5595
Leu Thr Pro Ala Asp Val Thr	Asn Ala Ala Thr Gln	Val Thr Asn
5600	5605	5610
Ala Lys Thr Gln Leu Asn Gly	Asn His Asn Leu Glu	Val Ala Lys
5615	5620	5625
Gln Asn Ala Asn Thr Ala Ile	Asp Gly Leu Thr Ser	Leu Asn Gly
5630	5635	5640

ES 2 563 646 T3

Pro	Gln	Lys	Ala	Lys	Leu	Lys	Glu	Gln	Val	Gly	Gln	Ala	Thr	Thr
5645						5650					5655			
Leu	Pro	Asn	Val	Gln	Thr	Val	Arg	Asp	Asn	Ala	Gln	Thr	Leu	Asn
5660						5665					5670			
Thr	Ala	Met	Lys	Gly	Leu	Arg	Asp	Ser	Ile	Ala	Asn	Glu	Ala	Thr
5675						5680					5685			
Ile	Lys	Ala	Gly	Gln	Asn	Tyr	Thr	Asp	Ala	Ser	Gln	Asn	Lys	Gln
5690						5695					5700			
Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Lys	Ala	Ile	Ile	Gly
5705						5710					5715			
Gln	Thr	Thr	Ser	Pro	Ser	Met	Asn	Ala	Gln	Glu	Ile	Asn	Gln	Ala
5720						5725					5730			
Lys	Asp	Gln	Val	Thr	Ala	Lys	Gln	Gln	Ala	Leu	Asn	Gly	Gln	Glu
5735						5740					5745			
Asn	Leu	Arg	Thr	Ala	Gln	Thr	Asn	Ala	Lys	Gln	His	Leu	Asn	Gly
5750						5755					5760			
Leu	Ser	Asp	Leu	Thr	Asp	Ala	Gln	Lys	Asp	Ala	Val	Lys	Arg	Gln
5765						5770					5775			
Ile	Glu	Gly	Ala	Thr	His	Val	Asn	Glu	Val	Thr	Gln	Ala	Gln	Asn
5780						5785					5790			
Asn	Ala	Asp	Ala	Leu	Asn	Thr	Ala	Met	Thr	Asn	Leu	Lys	Asn	Gly
5795						5800					5805			
Ile	Gln	Asp	Gln	Asn	Thr	Ile	Lys	Gln	Gly	Val	Asn	Phe	Thr	Asp
5810						5815					5820			
Ala	Asp	Glu	Ala	Lys	Arg	Asn	Ala	Tyr	Thr	Asn	Ala	Val	Thr	Gln
5825						5830					5835			
Ala	Glu	Gln	Ile	Leu	Asn	Lys	Ala	Gln	Gly	Pro	Asn	Thr	Ser	Lys
5840						5845					5850			
Asp	Gly	Val	Glu	Thr	Ala	Leu	Glu	Asn	Val	Gln	Arg	Ala	Lys	Asn
5855						5860					5865			
Glu	Leu	Asn	Gly	Asn	Gln	Asn	Val	Ala	Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Ala
5870						5875					5880			

Lys	Asn	Ala	Leu	Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Ile	Asn	Asn	Ala	Gln	Lys
5885						5890					5895			
Glu	Ala	Leu	Lys	Ser	Gln	Ile	Glu	Gly	Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Gly
5900						5905					5910			
Val	Asn	Gln	Val	Ser	Thr	Thr	Ala	Ser	Glu	Leu	Asn	Thr	Ala	Met
5915						5920					5925			
Ser	Asn	Leu	Gln	Asn	Gly	Ile	Asn	Asp	Glu	Ala	Ala	Thr	Lys	Ala
5930						5935					5940			
Ala	Gln	Lys	Tyr	Thr	Asp	Ala	Asp	Arg	Glu	Lys	Gln	Thr	Ala	Tyr
5945						5950					5955			
Asn	Asp	Ala	Val	Thr	Ala	Ala	Lys	Thr	Leu	Leu	Asp	Lys	Thr	Ala
5960						5965					5970			
Gly	Ser	Asn	Asp	Asn	Lys	Ala	Ala	Val	Glu	Gln	Ala	Leu	Gln	Arg
5975						5980					5985			
Val	Asn	Thr	Ala	Lys	Thr	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Glu	Arg	Leu	Asn
5990						5995					6000			
Glu	Ala	Lys	Asn	Thr	Ala	Lys	Gln	Gln	Val	Ala	Thr	Met	Ser	His
6005						6010					6015			
Leu	Thr	Asp	Ala	Gln	Lys	Ala	Asn	Leu	Thr	Ser	Gln	Ile	Glu	Ser
6020						6025					6030			
Gly	Thr	Thr	Val	Ala	Gly	Val	Gln	Gly	Ile	Gln	Ala	Asn	Ala	Gly
6035						6040					6045			
Thr	Leu	Asp	Gln	Ala	Met	Asn	Gln	Leu	Arg	Gln	Ser	Ile	Ala	Ser
6050						6055					6060			
Lys	Asp	Ala	Thr	Lys	Ser	Ser	Glu	Asp	Tyr	Gln	Asp	Ala	Asn	Ala
6065						6070					6075			
Asp	Leu	Gln	Asn	Ala	Tyr	Asn	Asp	Ala	Val	Thr	Asn	Ala	Glu	Gly
6080						6085					6090			
Ile	Ile	Ser	Ala	Thr	Asn	Asn	Pro	Glu	Met	Asn	Pro	Asp	Thr	Ile
6095						6100					6105			
Asn	Gln	Lys	Ala	Ser	Gln	Val	Asn	Ser	Ala	Lys	Ser	Ala	Leu	Asn
6110						6115					6120			

ES 2 563 646 T3

Gly Asp 6125	Glu Lys Leu Ala	Ala Ala 6130	Ala Lys Gln Thr	Ala Lys Ser Asp 6135
Ile Gly 6140	Arg Leu Thr Asp	Leu Asn Asn Ala Gln 6145	Arg Thr Ala Ala 6150	
Asn Ala 6155	Glu Val Asp Gln	Ala Pro Asn Leu Ala 6160	Ala Val Thr Ala 6165	
Ala Lys 6170	Asn Lys Ala Thr	Ser Leu Asn Thr Ala 6175	Met Gly Asn Leu 6180	
Lys His 6185	Ala Leu Ala Glu	Lys Asp Asn Thr Lys 6190	Arg Ser Val Asn 6195	
Tyr Thr 6200	Asp Ala Asp Gln	Pro Lys Gln Gln Ala 6205	Tyr Asp Thr Ala 6210	
Val Thr 6215	Gln Ala Glu Ala	Ile Thr Asn Ala Asn 6220	Gly Ser Asn Ala 6225	
Asn Glu 6230	Thr Gln Val Gln	Ala Ala Leu Asn Gln 6235	Leu Asn Gln Ala 6240	
Lys Asn 6245	Asp Leu Asn Gly	Asp Asn Lys Val Ala 6250	Gln Ala Lys Glu 6255	
Ser Ala 6260	Lys Arg Ala Leu	Ala Ser Tyr Ser Asn 6265	Leu Asn Asn Ala 6270	
Gln Ser 6275	Thr Ala Ala Ile	Ser Gln Ile Asp Asn 6280	Ala Thr Thr Val 6285	
Ala Gly 6290	Val Thr Ala Ala	Gln Asn Thr Ala Asn 6295	Glu Leu Asn Thr 6300	
Ala Met 6305	Gly Gln Leu Gln	Asn Gly Ile Asn Asp 6310	Gln Asn Thr Val 6315	
Lys Gln 6320	Gln Val Asn Phe	Thr Asp Ala Asp Gln 6325	Gly Lys Lys Asp 6330	
Ala Tyr 6335	Thr Asn Ala Val	Thr Asn Ala Gln Gly 6340	Ile Leu Asp Lys 6345	
Ala His 6350	Gly Gln Asn Met	Thr Lys Ala Gln Val 6355	Glu Ala Ala Leu 6360	
Asn Gln	Val Thr Thr Ala	Lys Asn Ala Leu Asn 6365	Gly Asp Ala Asn	

ES 2 563 646 T3

6365		6370		6375
Val Arg	Gln Ala Lys Ser	Asp	Ala Lys Ala Asn	Leu Gly Thr Leu
6380		6385		6390
Thr His	Leu Asn Asn Ala	Gln	Lys Gln Asp Leu	Thr Ser Gln Ile
6395		6400		6405
Glu Gly	Ala Thr Thr Val	Asn	Gly Val Asn Gly	Val Lys Thr Lys
6410		6415		6420
Ala Gln	Asp Leu Asp Gly	Ala	Met Gln Arg Leu	Gln Ser Ala Ile
6425		6430		6435
Ala Asn	Lys Asp Gln Thr	Lys	Ala Ser Glu Asn	Tyr Ile Asp Ala
6440		6445		6450
Asp Pro	Thr Lys Lys Thr	Ala	Phe Asp Asn Ala	Ile Thr Gln Ala
6455		6460		6465
Glu Ser	Tyr Leu Asn Lys	Asp	His Gly Ala Asn	Lys Asp Lys Gln
6470		6475		6480
Ala Val	Glu Gln Ala Ile	Gln	Ser Val Thr Ser	Thr Glu Asn Ala
6485		6490		6495
Leu Asn	Gly Asp Ala Asn	Leu	Gln Arg Ala Lys	Thr Glu Ala Ile
6500		6505		6510
Gln Ala	Ile Asp Asn Leu	Thr	His Leu Asn Thr	Pro Gln Lys Thr
6515		6520		6525
Ala Leu	Lys Gln Gln Val	Asn	Ala Ala Gln Arg	Val Ser Gly Val
6530		6535		6540
Thr Asp	Leu Lys Asn Ser	Ala	Thr Ser Leu Asn	Asn Ala Met Asp
6545		6550		6555
Gln Leu	Lys Gln Ala Ile	Ala	Asp His Asp Thr	Ile Val Ala Ser
6560		6565		6570
Gly Asn	Tyr Thr Asn Ala	Ser	Pro Asp Lys Gln	Gly Ala Tyr Thr
6575		6580		6585
Asp Ala	Tyr Asn Ala Ala	Lys	Asn Ile Val Asn	Gly Ser Pro Asn
6590		6595		6600
Val Ile	Thr Asn Ala Ala	Asp	Val Thr Ala Ala	Thr Gln Arg Val
6605		6610		6615

ES 2 563 646 T3

Asn 6620	Asn	Ala	Glu	Thr	Gly	Leu 6625	Asn	Gly	Asp	Thr	Asn 6630	Leu	Ala	Thr
Ala 6635	Lys	Gln	Gln	Ala	Lys	Asp 6640	Ala	Leu	Arg	Gln	Met 6645	Thr	His	Leu
Ser 6650	Asp	Ala	Gln	Lys	Gln	Ser 6655	Ile	Thr	Gly	Gln	Ile 6660	Asp	Ser	Ala
Thr 6665	Gln	Val	Thr	Gly	Val	Gln 6670	Ser	Val	Lys	Asp	Asn 6675	Ala	Thr	Asn
Leu 6680	Asp	Asn	Ala	Met	Asn	Gln 6685	Leu	Arg	Asn	Ser	Ile 6690	Ala	Asn	Lys
Asp 6695	Asp	Val	Lys	Ala	Ser	Gln 6700	Pro	Tyr	Val	Asp	Ala 6705	Asp	Arg	Asp
Lys 6710	Gln	Asn	Ala	Tyr	Asn	Thr 6715	Ala	Val	Thr	Asn	Ala 6720	Glu	Asn	Ile
Ile 6725	Asn	Ala	Thr	Ser	Gln	Pro 6730	Thr	Leu	Asp	Pro	Ser 6735	Ala	Val	Thr
Gln 6740	Ala	Ala	Asn	Gln	Val	Ser 6745	Thr	Asn	Lys	Thr	Ala 6750	Leu	Asn	Gly
Ala 6755	Gln	Asn	Leu	Ala	Asn	Lys 6760	Lys	Gln	Glu	Thr	Thr 6765	Ala	Asn	Ile
Asn 6770	Gln	Leu	Ser	His	Leu	Asn 6775	Asn	Ala	Gln	Lys	Gln 6780	Asp	Leu	Asn
Thr 6785	Gln	Val	Thr	Asn	Ala	Pro 6790	Asn	Ile	Ser	Thr	Val 6795	Asn	Gln	Val
Lys 6800	Thr	Lys	Ala	Glu	Gln	Leu 6805	Asp	Gln	Ala	Met	Glu 6810	Arg	Leu	Ile
Asn 6815	Gly	Ile	Gln	Asp	Lys	Asp 6820	Gln	Val	Lys	Gln	Ser 6825	Val	Asn	Phe
Thr 6830	Asp	Ala	Asp	Pro	Glu	Lys 6835	Gln	Thr	Ala	Tyr	Asn 6840	Asn	Ala	Val
Thr 6845	Ala	Ala	Glu	Asn	Ile	Ile 6850	Asn	Gln	Ala	Asn	Gly 6855	Thr	Asn	Ala

ES 2 563 646 T3

Asn	Gln	Ser	Gln	Val	Glu	Ala	Ala	Leu	Ser	Thr	Val	Thr	Thr	Thr
6860						6865					6870			
Lys	Gln	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Arg	Lys	Val	Thr	Asp	Ala	Lys	Asn
6875						6880					6885			
Asn	Ala	Asn	Gln	Thr	Leu	Ser	Thr	Leu	Asp	Asn	Leu	Asn	Asn	Ala
6890						6895					6900			
Gln	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Gly	Asn	Ile	Asn	Gln	Ala	His	Thr	Val
6905						6910					6915			
Ala	Glu	Val	Thr	Gln	Ala	Ile	Gln	Thr	Ala	Gln	Glu	Leu	Asn	Thr
6920						6925					6930			
Ala	Met	Gly	Asn	Leu	Lys	Asn	Ser	Leu	Asn	Asp	Lys	Asp	Thr	Thr
6935						6940					6945			
Leu	Gly	Ser	Gln	Asn	Phe	Ala	Asp	Ala	Asp	Pro	Glu	Lys	Lys	Asn
6950						6955					6960			
Ala	Tyr	Asn	Glu	Ala	Val	His	Asn	Ala	Glu	Asn	Ile	Leu	Asn	Lys
6965						6970					6975			
Ser	Thr	Gly	Thr	Asn	Val	Pro	Lys	Asp	Gln	Val	Glu	Ala	Ala	Met
6980						6985					6990			
Asn	Gln	Val	Asn	Ala	Thr	Lys	Ala	Ala	Leu	Asn	Gly	Thr	Gln	Asn
6995						7000					7005			
Leu	Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	His	Ala	Asn	Thr	Ala	Ile	Asp	Gly	Leu
7010						7015					7020			
Ser	His	Leu	Thr	Asn	Ala	Gln	Lys	Glu	Ala	Leu	Lys	Gln	Leu	Val
7025						7030					7035			
Gln	Gln	Ser	Thr	Thr	Val	Ala	Glu	Ala	Gln	Gly	Asn	Glu	Gln	Lys
7040						7045					7050			
Ala	Asn	Asn	Val	Asp	Ala	Ala	Met	Asp	Lys	Leu	Arg	Gln	Ser	Ile
7055						7060					7065			
Ala	Asp	Asn	Ala	Thr	Thr	Lys	Gln	Asn	Gln	Asn	Tyr	Thr	Asp	Ala
7070						7075					7080			
Ser	Gln	Asn	Lys	Lys	Asp	Ala	Tyr	Asn	Asn	Ala	Val	Thr	Thr	Ala
7085						7090					7095			

ES 2 563 646 T3

Gln Gly 7100	Ile Ile Asp Gln Thr 7105	Thr Ser Pro Thr Leu 7110	Asp Pro Thr
Val Ile 7115	Asn Gln Ala Ala Gly 7120	Gln Val Ser Thr Thr 7125	Lys Asn Ala
Leu Asn 7130	Gly Asn Glu Asn Leu 7135	Glu Ala Ala Lys Gln 7140	Gln Ala Ser
Gln Ser 7145	Leu Gly Ser Leu Asp 7150	Asn Leu Asn Asn Ala 7155	Gln Lys Gln
Thr Val 7160	Thr Asp Gln Ile Asn 7165	Gly Ala His Thr Val 7170	Asp Glu Ala
Asn Gln 7175	Ile Lys Gln Asn Ala 7180	Gln Asn Leu Asn Thr 7185	Ala Met Gly
Asn Leu 7190	Lys Gln Ala Ile Ala 7195	Asp Lys Asp Ala Thr 7200	Lys Ala Thr
Val Asn 7205	Phe Thr Asp Ala Asp 7210	Gln Ala Lys Gln Gln 7215	Ala Tyr Asn
Thr Ala 7220	Val Thr Asn Ala Glu 7225	Asn Ile Ser Lys Ala 7230	Asn Gly Asn
Ala Thr 7235	Gln Ala Glu Val Glu 7240	Gln Ala Ile Lys Gln 7245	Val Asn Ala
Ala Lys 7250	Gln Ala Leu Asn Gly 7255	Asn Ala Asn Val Gln 7260	His Ala Lys
Asp Glu 7265	Ala Thr Ala Leu Ile 7270	Asn Ser Ser Asn Asp 7275	Leu Asn Gln
Ala Gln 7280	Lys Asp Ala Leu Lys 7285	Gln Gln Val Gln Asn 7290	Ala Thr Thr
Val Ala 7295	Gly Val Asn Asn Val 7300	Lys Gln Thr Ala Gln 7305	Glu Leu Asn
Asn Ala 7310	Met Thr Gln Leu Lys 7315	Gln Gly Ile Ala Asp 7320	Lys Glu Gln
Thr Lys 7325	Ala Asp Gly Asn Phe 7330	Val Asn Ala Asp Pro 7335	Asp Lys Gln
Asn Ala	Tyr Asn Gln Ala Val	Ala Lys Ala Glu Ala	Leu Ile Ser

ES 2 563 646 T3

7340		7345		7350
Ala Thr 7355	Pro Asp Val Val	Val Thr Pro Ser Glu 7360	Ile Thr Ala Ala 7365	
Leu Asn 7370	Lys Val Thr Gln	Ala Lys Asn Asp Leu 7375	Asn Gly Asn Thr 7380	
Asn Leu 7385	Ala Thr Ala Lys	Gln Asn Val Gln His 7390	Ala Ile Asp Gln 7395	
Leu Pro 7400	Asn Leu Asn Gln	Ala Gln Arg Asp Glu 7405	Tyr Ser Lys Gln 7410	
Ile Thr 7415	Gln Ala Thr Leu	Val Pro Asn Val Asn 7420	Ala Ile Gln Gln 7425	
Ala Ala 7430	Thr Thr Leu Asn	Asp Ala Met Thr Gln 7435	Leu Lys Gln Gly 7440	
Ile Ala 7445	Asn Lys Ala Gln	Ile Lys Gly Ser Glu 7450	Asn Tyr His Asp 7455	
Ala Asp 7460	Thr Asp Lys Gln	Thr Ala Tyr Asp Asn 7465	Ala Val Thr Lys 7470	
Ala Glu 7475	Glu Leu Leu Lys	Gln Thr Thr Asn Pro 7480	Thr Met Asp Pro 7485	
Asn Thr 7490	Ile Gln Gln Ala	Leu Thr Lys Val Asn 7495	Asp Thr Asn Gln 7500	
Ala Leu 7505	Asn Gly Asn Gln	Lys Leu Ala Asp Ala 7510	Lys Gln Asp Ala 7515	
Lys Thr 7520	Thr Leu Gly Thr	Leu Asp His Leu Asn 7525	Asp Ala Gln Lys 7530	
Gln Ala 7535	Leu Thr Thr Gln	Val Glu Gln Ala Pro 7540	Asp Ile Ala Thr 7545	
Val Asn 7550	Asn Val Lys Gln	Asn Ala Gln Asn Leu 7555	Asn Asn Ala Met 7560	
Thr Asn 7565	Leu Asn Asn Ala	Leu Gln Asp Lys Thr 7570	Glu Thr Leu Asn 7575	
Ser Ile 7580	Asn Phe Thr Asp	Ala Asp Gln Ala Lys 7585	Lys Asp Ala Tyr 7590	

Thr	Asn	Ala	Val	Ser	His	Ala	Glu	Gly	Ile	Leu	Ser	Lys	Ala	Asn
7595						7600					7605			
Gly	Ser	Asn	Ala	Ser	Gln	Thr	Glu	Val	Glu	Gln	Ala	Met	Gln	Arg
7610						7615					7620			
Val	Asn	Glu	Ala	Lys	Gln	Ala	Leu	Asn	Gly	Asn	Asp	Asn	Val	Gln
7625						7630					7635			
Arg	Ala	Lys	Asp	Ala	Ala	Lys	Gln	Val	Ile	Thr	Asn	Ala	Asn	Asp
7640						7645					7650			
Leu	Asn	Gln	Ala	Gln	Lys	Asp	Ala	Leu	Lys	Gln	Gln	Val	Asp	Ala
7655						7660					7665			
Ala	Gln	Thr	Val	Ala	Asn	Val	Asn	Thr	Ile	Lys	Gln	Thr	Ala	Gln
7670						7675					7680			
Asp	Leu	Asn	Gln	Ala	Met	Thr	Gln	Leu	Lys	Gln	Gly	Ile	Ala	Asp
7685						7690					7695			
Lys	Asp	Gln	Thr	Lys	Ala	Asn	Gly	Asn	Phe	Val	Asn	Ala	Asp	Thr
7700						7705					7710			
Asp	Lys	Gln	Asn	Ala	Tyr	Asn	Asn	Ala	Val	Ala	His	Ala	Glu	Gln
7715						7720					7725			
Ile	Ile	Ser	Gly	Thr	Pro	Asn	Ala	Asn	Val	Asp	Pro	Gln	Gln	Val
7730						7735					7740			
Ala	Gln	Ala	Leu	Gln	Gln	Val	Asn	Gln	Ala	Lys	Gly	Asp	Leu	Asn
7745						7750					7755			
Gly	Asn	His	Asn	Leu	Gln	Val	Ala	Lys	Asp	Asn	Ala	Asn	Thr	Ala
7760						7765					7770			
Ile	Asp	Gln	Leu	Pro	Asn	Leu	Asn	Gln	Pro	Gln	Lys	Thr	Ala	Leu
7775						7780					7785			
Lys	Asp	Gln	Val	Ser	His	Ala	Glu	Leu	Val	Thr	Gly	Val	Asn	Ala
7790						7795					7800			
Ile	Lys	Gln	Asn	Ala	Asp	Ala	Leu	Asn	Asn	Ala	Met	Gly	Thr	Leu
7805						7810					7815			
Lys	Gln	Gln	Ile	Gln	Ala	Asn	Ser	Gln	Val	Pro	Gln	Ser	Val	Asp
7820						7825					7830			

Phe	Thr	Gln	Ala	Asp	Gln	Asp	Lys	Gln	Gln	Ala	Tyr	Asn	Asn	Ala
7835						7840					7845			
Ala	Asn	Gln	Ala	Gln	Gln	Ile	Ala	Asn	Gly	Ile	Pro	Thr	Pro	Val
7850						7855					7860			
Leu	Thr	Pro	Asp	Thr	Val	Thr	Gln	Ala	Val	Thr	Thr	Met	Asn	Gln
7865						7870					7875			
Ala	Lys	Asp	Ala	Leu	Asn	Gly	Asp	Glu	Lys	Leu	Ala	Gln	Ala	Lys
7880						7885					7890			
Gln	Glu	Ala	Leu	Ala	Asn	Leu	Asp	Thr	Leu	Arg	Asp	Leu	Asn	Gln
7895						7900					7905			
Pro	Gln	Arg	Asp	Ala	Leu	Arg	Asn	Gln	Ile	Asn	Gln	Ala	Gln	Ala
7910						7915					7920			
Leu	Ala	Thr	Val	Glu	Gln	Thr	Lys	Gln	Asn	Ala	Gln	Asn	Val	Asn
7925						7930					7935			
Thr	Ala	Met	Ser	Asn	Leu	Lys	Gln	Gly	Ile	Ala	Asn	Lys	Asp	Thr
7940						7945					7950			
Val	Lys	Ala	Ser	Glu	Asn	Tyr	His	Asp	Ala	Asp	Ala	Asp	Lys	Gln
7955						7960					7965			
Thr	Ala	Tyr	Thr	Asn	Ala	Val	Ser	Gln	Ala	Glu	Gly	Ile	Ile	Asn
7970						7975					7980			
Gln	Thr	Thr	Asn	Pro	Thr	Leu	Asn	Pro	Asp	Glu	Ile	Thr	Arg	Ala
7985						7990					7995			
Leu	Thr	Gln	Val	Thr	Asp	Ala	Lys	Asn	Gly	Leu	Asn	Gly	Glu	Ala
8000						8005					8010			
Lys	Leu	Ala	Thr	Glu	Lys	Gln	Asn	Ala	Lys	Asp	Ala	Val	Ser	Gly
8015						8020					8025			
Met	Thr	His	Leu	Asn	Asp	Ala	Gln	Lys	Gln	Ala	Leu	Lys	Gly	Gln
8030						8035					8040			
Ile	Asp	Gln	Ser	Pro	Glu	Ile	Ala	Thr	Val	Asn	Gln	Val	Lys	Gln
8045						8050					8055			
Thr	Ala	Thr	Ser	Leu	Asp	Gln	Ala	Met	Asp	Gln	Leu	Ser	Gln	Ala
8060						8065					8070			

Ile Asn 8075	Asp Lys Ala Gln Thr 8080	Leu Ala Asp Gly Asn 8085	Tyr Leu Asn
Ala Asp 8090	Pro Asp Lys Gln Asn 8095	Ala Tyr Lys Gln Ala 8100	Val Ala Lys
Ala Glu 8105	Ala Leu Leu Asn Lys 8110	Gln Ser Gly Thr Asn 8115	Glu Val Gln
Ala Gln 8120	Val Glu Ser Ile Thr 8125	Asn Glu Val Asn Ala 8130	Ala Lys Gln
Ala Leu 8135	Asn Gly Asn Asp Asn 8140	Leu Ala Asn Ala Lys 8145	Gln Gln Ala
Lys Gln 8150	Gln Leu Ala Asn Leu 8155	Thr His Leu Asn Asp 8160	Ala Gln Lys
Gln Ser 8165	Phe Glu Ser Gln Ile 8170	Thr Gln Ala Pro Leu 8175	Val Thr Asp
Val Thr 8180	Thr Ile Asn Gln Lys 8185	Ala Gln Thr Leu Asp 8190	His Ala Met
Glu Leu 8195	Leu Arg Asn Ser Val 8200	Ala Asp Asn Gln Thr 8205	Thr Leu Ala
Ser Glu 8210	Asp Tyr His Asp Ala 8215	Thr Ala Gln Arg Gln 8220	Asn Asp Tyr
Asn Gln 8225	Ala Val Thr Ala Ala 8230	Asn Asn Ile Ile Asn 8235	Gln Thr Thr
Ser Pro 8240	Thr Met Asn Pro Asp 8245	Asp Val Asn Gly Ala 8250	Thr Thr Gln
Val Asn 8255	Asn Thr Lys Val Ala 8260	Leu Asp Gly Asp Glu 8265	Asn Leu Ala
Ala Ala 8270	Lys Gln Gln Ala Asn 8275	Asn Arg Leu Asp Gln 8280	Leu Asp His
Leu Asn 8285	Asn Ala Gln Lys Gln 8290	Gln Leu Gln Ser Gln 8295	Ile Thr Gln
Ser Ser 8300	Asp Ile Ala Ala Val 8305	Asn Gly His Lys Gln 8310	Thr Ala Glu
Ser Leu	Asn Thr Ala Met Gly	Asn Leu Ile Asn Ala	Ile Ala Asp

ES 2 563 646 T3

8315	8320	8325
His Gln Ala Val Glu Gln Arg Gly Asn Phe Ile Asn Ala Asp Thr 8330 8335 8340		
Asp Lys Gln Thr Ala Tyr Asn Thr Ala Val Asn Glu Ala Ala Ala 8345 8350 8355		
Met Ile Asn Lys Gln Thr Gly Gln Asn Ala Asn Gln Thr Glu Val 8360 8365 8370		
Glu Gln Ala Ile Thr Lys Val Gln Thr Thr Leu Gln Ala Leu Asn 8375 8380 8385		
Gly Asp His Asn Leu Gln Val Ala Lys Thr Asn Ala Thr Gln Ala 8390 8395 8400		
Ile Asp Ala Leu Thr Ser Leu Asn Asp Pro Gln Lys Thr Ala Leu 8405 8410 8415		
Lys Asp Gln Val Thr Ala Ala Thr Leu Val Thr Ala Val His Gln 8420 8425 8430		
Ile Glu Gln Asn Ala Asn Thr Leu Asn Gln Ala Met His Gly Leu 8435 8440 8445		
Arg Gln Ser Ile Gln Asp Asn Ala Ala Thr Lys Ala Asn Ser Lys 8450 8455 8460		
Tyr Ile Asn Glu Asp Gln Pro Glu Gln Gln Asn Tyr Asp Gln Ala 8465 8470 8475		
Val Gln Ala Ala Asn Asn Ile Ile Asn Glu Gln Thr Ala Thr Leu 8480 8485 8490		
Asp Asn Asn Ala Ile Asn Gln Ala Ala Thr Thr Val Asn Thr Thr 8495 8500 8505		
Lys Ala Ala Leu His Gly Asp Val Lys Leu Gln Asn Asp Lys Asp 8510 8515 8520		
His Ala Lys Gln Thr Val Ser Gln Leu Ala His Leu Asn Asn Ala 8525 8530 8535		
Gln Lys His Met Glu Asp Thr Leu Ile Asp Ser Glu Thr Thr Arg 8540 8545 8550		
Thr Ala Val Lys Gln Asp Leu Thr Glu Ala Gln Ala Leu Asp Gln 8555 8560 8565		

ES 2 563 646 T3

Leu	Met	Asp	Ala	Leu	Gln	Gln	Ser	Ile	Ala	Asp	Lys	Asp	Ala	Thr
	8570											8580		
Arg	Ala	Ser	Ser	Ala	Tyr	Val	Asn	Ala	Glu	Pro	Asn	Lys	Lys	Gln
	8585											8595		
Ser	Tyr	Asp	Glu	Ala	Val	Gln	Asn	Ala	Glu	Ser	Ile	Ile	Ala	Gly
	8600											8610		
Leu	Asn	Asn	Pro	Thr	Ile	Asn	Lys	Gly	Asn	Val	Ser	Ser	Ala	Thr
	8615											8625		
Gln	Ala	Val	Ile	Ser	Ser	Lys	Asn	Ala	Leu	Asp	Gly	Val	Glu	Arg
	8630											8640		
Leu	Ala	Gln	Asp	Lys	Gln	Thr	Ala	Gly	Asn	Ser	Leu	Asn	His	Leu
	8645											8655		
Asp	Gln	Leu	Thr	Pro	Ala	Gln	Gln	Gln	Ala	Leu	Glu	Asn	Gln	Ile
	8660											8670		
Asn	Asn	Ala	Thr	Thr	Arg	Gly	Glu	Val	Ala	Gln	Lys	Leu	Thr	Glu
	8675											8685		
Ala	Gln	Ala	Leu	Asn	Gln	Ala	Met	Glu	Ala	Leu	Arg	Asn	Ser	Ile
	8690											8700		
Gln	Asp	Gln	Gln	Gln	Thr	Glu	Ala	Gly	Ser	Lys	Phe	Ile	Asn	Glu
	8705											8715		
Asp	Lys	Pro	Gln	Lys	Asp	Ala	Tyr	Gln	Ala	Ala	Val	Gln	Asn	Ala
	8720											8730		
Lys	Asp	Leu	Ile	Asn	Gln	Thr	Asn	Asn	Pro	Thr	Leu	Asp	Lys	Ala
	8735											8745		
Gln	Val	Glu	Gln	Leu	Thr	Gln	Ala	Val	Asn	Gln	Ala	Lys	Asp	Asn
	8750											8760		
Leu	His	Gly	Asp	Gln	Lys	Leu	Ala	Asp	Asp	Lys	Gln	His	Ala	Val
	8765											8775		
Thr	Asp	Leu	Asn	Gln	Leu	Asn	Gly	Leu	Asn	Asn	Pro	Gln	Arg	Gln
	8780											8790		
Ala	Leu	Glu	Ser	Gln	Ile	Asn	Asn	Ala	Ala	Thr	Arg	Gly	Glu	Val
	8795											8805		

ES 2 563 646 T3

Ala Gln Lys Leu Ala Glu Ala Lys Ala Leu Asp Gln Ala Met Gln 8810 8815 8820
Ala Leu Arg Asn Ser Ile Gln Asp Gln Gln Gln Thr Glu Ser Gly 8825 8830 8835
Ser Lys Phe Ile Asn Glu Asp Lys Pro Gln Lys Asp Ala Tyr Gln 8840 8845 8850
Ala Ala Val Gln Asn Ala Lys Asp Leu Ile Asn Gln Thr Gly Asn 8855 8860 8865
Pro Thr Leu Asp Lys Ser Gln Val Glu Gln Leu Thr Gln Ala Val 8870 8875 8880
Thr Thr Ala Lys Asp Asn Leu His Gly Asp Gln Lys Leu Ala Arg 8885 8890 8895
Asp Gln Gln Gln Ala Val Thr Thr Val Asn Ala Leu Pro Asn Leu 8900 8905 8910
Asn His Ala Gln Gln Gln Ala Leu Thr Asp Ala Ile Asn Ala Ala 8915 8920 8925
Pro Thr Arg Thr Glu Val Ala Gln His Val Gln Thr Ala Thr Glu 8930 8935 8940
Leu Asp His Ala Met Glu Thr Leu Lys Asn Lys Val Asp Gln Val 8945 8950 8955
Asn Thr Asp Lys Ala Gln Pro Asn Tyr Thr Glu Ala Ser Thr Asp 8960 8965 8970
Lys Lys Glu Ala Val Asp Gln Ala Leu Gln Ala Ala Glu Ser Ile 8975 8980 8985
Thr Asp Pro Thr Asn Gly Ser Asn Ala Asn Lys Asp Ala Val Asp 8990 8995 9000
Gln Val Leu Thr Lys Leu Gln Glu Lys Glu Asn Glu Leu Asn Gly 9005 9010 9015
Asn Glu Arg Val Ala Glu Ala Lys Thr Gln Ala Lys Gln Thr Ile 9020 9025 9030
Asp Gln Leu Thr His Leu Asn Ala Asp Gln Ile Ala Thr Ala Lys 9035 9040 9045

ES 2 563 646 T3

Gln	Asn	Ile	Asp	Gln	Ala	Thr	Lys	Leu	Gln	Pro	Ile	Ala	Glu	Leu
	9050					9055					9060			
Val	Asp	Gln	Ala	Thr	Gln	Leu	Asn	Gln	Ser	Met	Asp	Gln	Leu	Gln
	9065					9070					9075			
Gln	Ala	Val	Asn	Glu	His	Ala	Asn	Val	Glu	Gln	Thr	Val	Asp	Tyr
	9080					9085					9090			
Thr	Gln	Ala	Asp	Ser	Asp	Lys	Gln	Asn	Ala	Tyr	Lys	Gln	Ala	Ile
	9095					9100					9105			
Ala	Asp	Ala	Glu	Asn	Val	Leu	Lys	Gln	Asn	Ala	Asn	Lys	Gln	Gln
	9110					9115					9120			
Val	Asp	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn	Ile	Leu	Asn	Ala	Lys	Gln	Ala	Leu
	9125					9130					9135			
Asn	Gly	Asp	Glu	Arg	Val	Ala	Leu	Ala	Lys	Thr	Asn	Gly	Lys	His
	9140					9145					9150			
Asp	Ile	Asp	Gln	Leu	Asn	Ala	Leu	Asn	Asn	Ala	Gln	Gln	Asp	Gly
	9155					9160					9165			
Phe	Lys	Gly	Arg	Ile	Asp	Gln	Ser	Asn	Asp	Leu	Asn	Gln	Ile	Gln
	9170					9175					9180			
Gln	Ile	Val	Asp	Glu	Ala	Lys	Ala	Leu	Asn	Arg	Ala	Met	Asp	Gln
	9185					9190					9195			
Leu	Ser	Gln	Glu	Ile	Thr	Asp	Asn	Glu	Gly	Arg	Thr	Lys	Gly	Ser
	9200					9205					9210			
Thr	Asn	Tyr	Val	Asn	Ala	Asp	Thr	Gln	Val	Lys	Gln	Val	Tyr	Asp
	9215					9220					9225			
Glu	Thr	Val	Asp	Lys	Ala	Lys	Gln	Ala	Leu	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly
	9230					9235					9240			
Gln	Asn	Leu	Thr	Ala	Lys	Gln	Val	Ile	Lys	Leu	Asn	Asp	Ala	Val
	9245					9250					9255			
Thr	Ala	Ala	Lys	Lys	Ala	Leu	Asn	Gly	Glu	Glu	Arg	Leu	Asn	Asn
	9260					9265					9270			
Arg	Lys	Ala	Glu	Ala	Leu	Gln	Arg	Leu	Asp	Gln	Leu	Thr	His	Leu
	9275					9280					9285			
Asn	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Leu	Ala	Ile	Gln	Gln	Ile	Asn	Asn	Ala

ES 2 563 646 T3

9290	9295	9300
Glu Thr Leu Asn Lys Ala Ser Arg Ala Ile Asn Arg Ala Thr Lys 9305 9310 9315		
Leu Asp Asn Ala Met Gly Ala Val Gln Gln Tyr Ile Asp Glu Gln 9320 9325 9330		
His Leu Gly Val Ile Ser Ser Thr Asn Tyr Ile Asn Ala Asp Asp 9335 9340 9345		
Asn Leu Lys Ala Asn Tyr Asp Asn Ala Ile Ala Asn Ala Ala His 9350 9355 9360		
Glu Leu Asp Lys Val Gln Gly Asn Ala Ile Ala Lys Ala Glu Ala 9365 9370 9375		
Glu Gln Leu Lys Gln Asn Ile Ile Asp Ala Gln Asn Ala Leu Asn 9380 9385 9390		
Gly Asp Gln Asn Leu Ala Asn Ala Lys Asp Lys Ala Asn Ala Phe 9395 9400 9405		
Val Asn Ser Leu Asn Gly Leu Asn Gln Gln Gln Gln Asp Leu Ala 9410 9415 9420		
His Lys Ala Ile Asn Asn Ala Asp Thr Val Ser Asp Val Thr Asp 9425 9430 9435		
Ile Val Asn Asn Gln Ile Asp Leu Asn Asp Ala Met Glu Thr Leu 9440 9445 9450		
Lys His Leu Val Asp Asn Glu Ile Pro Asn Ala Glu Gln Thr Val 9455 9460 9465		
Asn Tyr Gln Asn Ala Asp Asp Asn Ala Lys Thr Asn Phe Asp Asp 9470 9475 9480		
Ala Lys Arg Leu Ala Asn Thr Leu Leu Asn Ser Asp Asn Thr Asn 9485 9490 9495		
Val Asn Asp Ile Asn Gly Ala Ile Gln Ala Val Asn Asp Ala Ile 9500 9505 9510		
His Asn Leu Asn Gly Asp Gln Arg Leu Gln Asp Ala Lys Asp Lys 9515 9520 9525		
Ala Ile Gln Ser Ile Asn Gln Ala Leu Ala Asn Lys Leu Lys Glu 9530 9535 9540		

ES 2 563 646 T3

Ile	Glu	Ala	Ser	Asn	Ala	Thr	Asp	Gln	Asp	Lys	Leu	Ile	Ala	Lys
9545						9550					9555			
Asn	Lys	Ala	Glu	Glu	Leu	Ala	Asn	Ser	Ile	Ile	Asn	Asn	Ile	Asn
9560						9565					9570			
Lys	Ala	Thr	Ser	Asn	Gln	Ala	Val	Ser	Gln	Val	Gln	Thr	Ala	Gly
9575						9580					9585			
Asn	His	Ala	Ile	Glu	Gln	Val	His	Ala	Asn	Glu	Ile	Pro	Lys	Ala
9590						9595					9600			
Lys	Ile	Asp	Ala	Asn	Lys	Asp	Val	Asp	Lys	Gln	Val	Gln	Ala	Leu
9605						9610					9615			
Ile	Asp	Glu	Ile	Asp	Arg	Asn	Pro	Asn	Leu	Thr	Asp	Lys	Glu	Lys
9620						9625					9630			
Gln	Ala	Leu	Lys	Asp	Arg	Ile	Asn	Gln	Ile	Leu	Gln	Gln	Gly	His
9635						9640					9645			
Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Ala	Met	Thr	Lys	Glu	Glu	Ile	Glu	Gln	Ala
9650						9655					9660			
Lys	Ala	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Leu	Gln	Asp	Ile	Lys	Asp	Leu	Val
9665						9670					9675			
Lys	Ala	Lys	Glu	Asp	Ala	Lys	Gln	Asp	Val	Asp	Lys	Gln	Val	Gln
9680						9685					9690			
Ala	Leu	Ile	Asp	Glu	Ile	Asp	Gln	Asn	Pro	Asn	Leu	Thr	Asp	Lys
9695						9700					9705			
Glu	Lys	Gln	Ala	Leu	Lys	Tyr	Arg	Ile	Asn	Gln	Ile	Leu	Gln	Gln
9710						9715					9720			
Gly	His	Asn	Asp	Ile	Asn	Asn	Ala	Leu	Thr	Lys	Glu	Glu	Ile	Glu
9725						9730					9735			
Gln	Ala	Lys	Ala	Gln	Leu	Ala	Gln	Ala	Leu	Gln	Asp	Ile	Lys	Asp
9740						9745					9750			
Leu	Val	Lys	Ala	Lys	Glu	Asp	Ala	Lys	Asn	Ala	Ile	Lys	Ala	Leu
9755						9760					9765			
Ala	Asn	Ala	Lys	Arg	Asp	Gln	Ile	Asn	Ser	Asn	Pro	Asp	Leu	Thr
9770						9775					9780			

ES 2 563 646 T3

Pro Glu 9785	Gln Lys Ala Lys Ala 9790	Leu Lys Glu Ile Asp 9795	Glu Ala Glu
Lys Arg 9800	Ala Leu Gln Asn Val 9805	Glu Asn Ala Gln Thr 9810	Ile Asp Gln
Leu Asn 9815	Arg Gly Leu Asn Leu 9820	Gly Leu Asp Asp Ile 9825	Arg Asn Thr
His Val 9830	Trp Glu Val Asp Glu 9835	Gln Pro Ala Val Asn 9840	Glu Ile Phe
Glu Ala 9845	Thr Pro Glu Gln Ile 9850	Leu Val Asn Gly Glu 9855	Leu Ile Val
His Arg 9860	Asp Asp Ile Ile Thr 9865	Glu Gln Asp Ile Leu 9870	Ala His Ile
Asn Leu 9875	Ile Asp Gln Leu Ser 9880	Ala Glu Val Ile Asp 9885	Thr Pro Ser
Thr Ala 9890	Thr Ile Ser Asp Ser 9895	Leu Thr Ala Lys Val 9900	Glu Val Thr
Leu Leu 9905	Asp Gly Ser Lys Val 9910	Ile Val Asn Val Pro 9915	Val Lys Val
Val Glu 9920	Lys Glu Leu Ser Val 9925	Val Lys Gln Gln Ala 9930	Ile Glu Ser
Ile Glu 9935	Asn Ala Ala Gln Gln 9940	Lys Ile Asn Glu Ile 9945	Asn Asn Ser
Val Thr 9950	Leu Thr Leu Glu Gln 9955	Lys Glu Ala Ala Ile 9960	Ala Glu Val
Asn Lys 9965	Leu Lys Gln Gln Ala 9970	Ile Asp His Val Asn 9975	Asn Ala Pro
Asp Val 9980	His Ser Val Glu Glu 9985	Ile Gln Gln Gln Glu 9990	Gln Ala His
Ile Glu 9995	Gln Phe Asn Pro Glu 10000	Gln Phe Thr Ile Glu 10005	Gln Ala Lys
Ser Asn 10010	Ala Ile Lys Ser Ile 10015	Glu Asp Ala Ile Gln 10020	His Met Ile

ES 2 563 646 T3

Asp Glu 10025	Ile Lys Ala Arg Thr 10030	Asp Leu Thr Asp Lys 10035	Glu Lys Gln
Glu Ala 10040	Ile Ala Lys Leu Asn 10045	Gln Leu Lys Glu Gln 10050	Ala Ile Gln
Ala Ile 10055	Gln Arg Ala Gln Ser 10060	Ile Asp Glu Ile Ser 10065	Glu Gln Leu
Glu Gln 10070	Phe Lys Ala Gln Met 10075	Lys Ala Ala Asn Pro 10080	Thr Ala Lys
Glu Leu 10085	Ala Lys Arg Lys Gln 10090	Glu Ala Ile Ser Arg 10095	Ile Lys Asp
Phe Ser 10100	Asn Glu Lys Ile Asn 10105	Ser Ile Arg Asn Ser 10110	Glu Ile Gly
Thr Ala 10115	Asp Glu Lys Gln Ala 10120	Ala Met Asn Gln Ile 10125	Asn Glu Ile
Val Leu 10130	Glu Thr Ile Arg Asp 10135	Ile Asn Asn Ala His 10140	Thr Leu Gln
Gln Val 10145	Glu Ala Ala Leu Asn 10150	Asn Gly Ile Ala Arg 10155	Ile Ser Ala
Val Gln 10160	Ile Val Thr Ser Asp 10165	Arg Ala Lys Gln Ser 10170	Ser Ser Thr
Gly Asn 10175	Glu Ser Asn Ser His 10180	Leu Thr Ile Gly Tyr 10185	Gly Thr Ala
Asn His 10190	Pro Phe Asn Ser Ser 10195	Thr Ile Gly His Lys 10200	Lys Lys Leu
Asp Glu 10205	Asp Asp Asp Ile Asp 10210	Pro Leu His Met Arg 10215	His Phe Ser
Asn Asn 10220	Phe Gly Asn Val Ile 10225	Lys Asn Ala Ile Gly 10230	Val Val Gly
Ile Ser 10235	Gly Leu Leu Ala Ser 10240	Phe Trp Phe Phe Ile 10245	Ala Lys Arg
Arg Arg 10250	Lys Glu Asp Glu Glu 10255	Glu Glu Leu Glu Ile 10260	Arg Asp Asn
Asn Lys	Asp Ser Ile Lys Glu	Thr Leu Asp Asp Thr	Lys His Leu

10265	10270	10275
Pro Leu 10280	Leu Phe Ala Lys Arg 10285	Arg Arg Lys Glu Asp 10290
Val Thr 10295	Val Glu Glu Lys Asp 10300	Ser Leu Asn Asn Gly 10305
Asp Lys 10310	Val Lys His Thr Pro 10315	Phe Phe Leu Pro Lys 10320
Lys Glu 10325	Asp Glu Glu Asp Val 10330	Glu Val Thr Asn Glu 10335
Glu Lys 10340	Val Leu Lys Asp Asn 10345	Glu His Ser Pro Leu 10350
Lys Arg 10355	Arg Lys Asp Lys Glu 10360	Glu Asp Val Glu Thr 10365
Ile Glu 10370	Ser Lys Asp Glu Asp 10375	Val Pro Leu Leu Leu 10380
Lys Asn 10385	Gln Lys Asp Asn Gln 10390	Ser Lys Asp Lys Lys 10395
Lys Asn 10400	Thr Ser Lys Lys Val 10405	Ala Ala Lys Lys Lys 10410
Ala Lys 10415	Lys Asn Lys Lys	

<210> 25
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.

<400> 25

ES 2 563 646 T3

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

Gln Ile Met Asn Ser Asn His Ala Lys Ala Ser Val Thr Glu Ser Val
20 25 30

Asp Lys Lys Phe Val Val Pro Glu Ser Gly Ile Asn Lys Ile Ile Pro
35 40 45

Ala Tyr Asp Glu Phe Lys Asn Ser Pro Lys Val Asn Val Ser Asn Leu
50 55 60

ES 2 563 646 T3

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

Ser Tyr Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Phe Lys Gly Ser Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Arg Val
340

<210> 26
<211> 130
<212> PRT
<213> Staphylococcus sp.

<400> 26

Met Asn Phe Asn Asp Ile Glu Thr Met Val Lys Ser Lys Phe Lys Asp
1 5 10 15

Ile Lys Lys His Ala Glu Glu Ile Ala His Glu Ile Glu Val Arg Ser
20 25 30

Gly Tyr Leu Arg Lys Ala Glu Gln Tyr Lys Arg Leu Glu Phe Asn Leu
35 40 45

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

Ala Lys Ser Ser Ala Asn Lys Asp Ser Val Thr Val Lys Gly Lys Ala
65 70 75 80

Pro Asn Thr Leu Tyr Ile Glu Lys Arg Asn Leu Met Lys Gln Lys Leu
85 90 95

Glu Met Leu Gly Glu Asp Ile Asp Lys Asn Lys Glu Ser Leu Gln Lys
100 105 110

Ala Lys Glu Ile Ala Gly Glu Lys Ala Ser Glu Tyr Phe Asn Lys Ala
115 120 125

Met Asn
130

<210> 27
<211> 636
<212> PRT
<213> Staphylococcus sp.

<400> 27

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

Leu Phe Thr Trp Asp Asn Lys Ala Asp Ala Ile Val Thr Lys Asp Tyr
 20 25 30

ES 2 563 646 T3

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

ES 2 563 646 T3

Glu Thr Lys Lys Ala Val Lys Glu Ala Asp Asp Ser Trp Lys Lys Lys
 290 295 300
 Thr Val Lys Lys Tyr Gly Glu Thr Glu Thr Lys Ser Pro Val Val Lys
 305 310 315 320
 Glu Glu Lys Lys Val Glu Glu Pro Gln Ala Pro Lys Val Asp Asn Gln
 325 330 335
 Gln Glu Val Lys Thr Thr Ala Gly Lys Ala Glu Glu Thr Thr Gln Pro
 340 345 350
 Val Ala Gln Pro Leu Val Lys Ile Pro Gln Gly Thr Ile Thr Gly Glu
 355 360 365
 Ile Val Lys Gly Pro Glu Tyr Pro Thr Met Glu Asn Lys Thr Val Gln
 370 375 380
 Gly Glu Ile Val Gln Gly Pro Asp Phe Leu Thr Met Glu Gln Ser Gly
 385 390 395 400
 Pro Ser Leu Ser Asn Asn Tyr Thr Asn Pro Pro Leu Thr Asn Pro Ile
 405 410 415
 Leu Glu Gly Leu Glu Gly Ser Ser Ser Lys Leu Glu Ile Lys Pro Gln
 420 425 430
 Gly Thr Glu Ser Thr Leu Lys Gly Thr Gln Gly Glu Ser Ser Asp Ile
 435 440 445
 Glu Val Lys Pro Gln Ala Thr Glu Thr Thr Glu Ala Ser Gln Tyr Gly
 450 455 460
 Pro Arg Pro Gln Phe Asn Lys Thr Pro Lys Tyr Val Lys Tyr Arg Asp
 465 470 475 480
 Ala Gly Thr Gly Ile Arg Glu Tyr Asn Asp Gly Thr Phe Gly Tyr Glu
 485 490 495
 Ala Arg Pro Arg Phe Asn Lys Pro Ser Glu Thr Asn Ala Tyr Asn Val
 500 505 510
 Thr Thr His Ala Asn Gly Gln Val Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Thr Tyr
 515 520 525
 Lys Lys Pro Ser Glu Thr Asn Ala Tyr Asn Val Thr Thr His Ala Asn
 530 535 540
 Gly Gln Val Ser Tyr Gly Ala Arg Pro Thr Gln Asn Lys Pro Ser Lys

ES 2 563 646 T3

545		550		555		560									
Thr	Asn	Ala	Tyr	Asn	Val	Thr	Thr	His	Gly	Asn	Gly	Gln	Val	Ser	Tyr
				565					570					575	
Gly	Ala	Arg	Pro	Thr	Gln	Asn	Lys	Pro	Ser	Lys	Thr	Asn	Ala	Tyr	Asn
			580					585					590		
Val	Thr	Thr	His	Ala	Asn	Gly	Gln	Val	Ser	Tyr	Gly	Ala	Arg	Pro	Thr
		595					600					605			
Tyr	Lys	Lys	Pro	Ser	Lys	Thr	Asn	Ala	Tyr	Asn	Val	Thr	Thr	His	Ala
	610					615					620				
Asp	Gly	Thr	Ala	Thr	Tyr	Gly	Pro	Arg	Val	Thr	Lys				
625					630					635					

<210> 28
 <211> 745
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.

<400> 28

ES 2 563 646 T3

Ala	Glu	Gln	His	Thr	Pro	Met	Lys	Ala	His	Ala	Val	Thr	Thr	Ile	Asp
1				5					10					15	
Lys	Ala	Thr	Thr	Asp	Lys	Gln	Gln	Val	Pro	Pro	Thr	Lys	Glu	Ala	Ala
			20					25					30		
His	His	Ser	Gly	Lys	Glu	Ala	Ala	Thr	Asn	Val	Ser	Ala	Ser	Ala	Gln
		35					40					45			
Gly	Thr	Ala	Asp	Asp	Thr	Asn	Ser	Lys	Val	Thr	Ser	Asn	Ala	Pro	Ser
	50					55					60				
Asn	Lys	Pro	Ser	Thr	Val	Val	Ser	Thr	Lys	Val	Asn	Glu	Thr	Arg	Asp
65					70					75					80
Val	Asp	Thr	Gln	Gln	Ala	Ser	Thr	Gln	Lys	Pro	Thr	His	Thr	Ala	Thr
				85					90					95	
Phe	Lys	Leu	Ser	Asn	Ala	Lys	Thr	Ala	Ser	Leu	Ser	Pro	Arg	Met	Phe
			100					105					110		
Ala	Ala	Asn	Ala	Pro	Gln	Thr	Thr	Thr	His	Lys	Ile	Leu	His	Thr	Asn
		115					120					125			
Asp	Ile	His	Gly	Arg	Leu	Ala	Glu	Glu	Lys	Gly	Arg	Val	Ile	Gly	Met
	130					135					140				

Ala 145	Lys	Leu	Lys	Thr	Val 150	Lys	Glu	Gln	Glu	Lys 155	Pro	Asp	Leu	Met	Leu 160
Asp	Ala	Gly	Asp	Ala 165	Phe	Gln	Gly	Leu	Pro 170	Leu	Ser	Asn	Gln	Ser 175	Lys
Gly	Glu	Glu	Met 180	Ala	Lys	Ala	Met	Asn 185	Ala	Val	Gly	Tyr	Asp 190	Ala	Met
Ala	Val	Gly 195	Asn	His	Glu	Phe	Asp 200	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln 205	Leu	Lys	Lys
Leu	Glu 210	Gly	Met	Leu	Asp	Phe 215	Pro	Met	Leu	Ser	Thr 220	Asn	Val	Tyr	Lys
Asp 225	Gly	Lys	Arg	Ala	Phe 230	Lys	Pro	Ser	Thr	Ile 235	Val	Thr	Lys	Asn	Gly 240
Ile	Arg	Tyr	Gly	Ile 245	Ile	Gly	Val	Thr	Thr 250	Pro	Glu	Thr	Lys	Thr 255	Lys
Thr	Arg	Pro	Glu 260	Gly	Ile	Lys	Gly	Val 265	Glu	Phe	Arg	Asp	Pro 270	Leu	Gln
Ser	Val	Thr 275	Ala	Glu	Met	Met	Arg 280	Ile	Tyr	Lys	Asp	Val 285	Asp	Thr	Phe
Val 290	Val	Ile	Ser	His	Leu	Gly 295	Ile	Asp	Pro	Ser	Thr 300	Gln	Glu	Thr	Trp
Arg 305	Gly	Asp	Tyr	Leu	Val 310	Lys	Gln	Leu	Ser	Gln 315	Asn	Pro	Gln	Leu	Lys 320
Lys	Arg	Ile	Thr	Val 325	Ile	Asp	Gly	His	Ser 330	His	Thr	Val	Leu	Gln 335	Asn
Gly	Gln	Ile	Tyr 340	Asn	Asn	Asp	Ala	Leu 345	Ala	Gln	Thr	Gly	Thr 350	Ala	Leu
Ala	Asn	Ile 355	Gly	Lys	Ile	Thr	Phe 360	Asn	Tyr	Arg	Asn	Gly 365	Glu	Val	Ser
Asn	Ile 370	Lys	Pro	Ser	Leu	Ile 375	Asn	Val	Lys	Asp	Val 380	Glu	Asn	Val	Thr
Pro 385	Asn	Lys	Ala	Leu	Ala 390	Glu	Gln	Ile	Asn	Gln 395	Ala	Asp	Gln	Thr	Phe 400

Arg Ala Gln Thr Ala Glu Val Ile Ile Pro Asn Asn Thr Ile Asp Phe
 405 410 415
 Lys Gly Glu Arg Asp Asp Val Arg Thr Arg Glu Thr Asn Leu Gly Asn
 420 425 430
 Ala Ile Ala Asp Ala Met Glu Ala Tyr Gly Val Lys Asn Phe Ser Lys
 435 440 445
 Lys Thr Asp Phe Ala Val Thr Asn Gly Gly Gly Ile Arg Ala Ser Ile
 450 455 460
 Ala Lys Gly Lys Val Thr Arg Tyr Asp Leu Ile Ser Val Leu Pro Phe
 465 470 475 480
 Gly Asn Thr Ile Ala Gln Ile Asp Val Lys Gly Ser Asp Val Trp Thr
 485 490 495
 Ala Phe Glu His Ser Leu Gly Ala Pro Thr Thr Gln Lys Asp Gly Lys
 500 505 510
 Thr Val Leu Thr Ala Asn Gly Gly Leu Leu His Ile Ser Asp Ser Ile
 515 520 525
 Arg Val Tyr Tyr Asp Ile Asn Lys Pro Ser Gly Lys Arg Ile Asn Ala
 530 535 540
 Ile Gln Ile Leu Asn Lys Glu Thr Gly Lys Phe Glu Asn Ile Asp Leu
 545 550 555 560
 Lys Arg Val Tyr His Val Thr Met Asn Asp Phe Thr Ala Ser Gly Gly
 565 570 575
 Asp Gly Tyr Ser Met Phe Gly Gly Pro Arg Glu Glu Gly Ile Ser Leu
 580 585 590
 Asp Gln Val Leu Ala Ser Tyr Leu Lys Thr Ala Asn Leu Ala Lys Tyr
 595 600 605
 Asp Thr Thr Glu Pro Gln Arg Met Leu Leu Gly Lys Pro Ala Val Ser
 610 615 620
 Glu Gln Pro Ala Lys Gly Gln Gln Gly Ser Lys Gly Ser Lys Ser Gly
 625 630 635 640
 Lys Asp Thr Gln Pro Ile Gly Asp Asp Lys Val Met Asp Pro Ala Lys
 645 650 655
 Lys Pro Ala Pro Gly Lys Val Val Leu Leu Leu Ala His Arg Gly Thr

ES 2 563 646 T3

660							665					670				
Val	Ser	Ser	Gly	Thr	Glu	Gly	Ser	Gly	Arg	Thr	Ile	Glu	Gly	Ala	Thr	
		675					680					685				
Val	Ser	Ser	Lys	Ser	Gly	Lys	Gln	Leu	Ala	Arg	Met	Ser	Val	Pro	Lys	
		690				695					700					
Gly	Ser	Ala	His	Glu	Lys	Gln	Leu	Pro	Lys	Thr	Gly	Thr	Asn	Gln	Ser	
705					710					715					720	
Ser	Ser	Pro	Glu	Ala	Met	Phe	Val	Leu	Leu	Ala	Gly	Ile	Gly	Leu	Ile	
				725					730					735		
Ala	Thr	Val	Arg	Arg	Arg	Lys	Ala	Ser								
			740				745									

<210> 29
 <211> 628
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.

<400> 29

Met Ser Asp Arg Phe Ile Lys Phe Asn Asp Glu Gln Leu Asp Ala Lys
1 5 10 15

Gln Val Met Met Leu Gln Asp Leu Ala Arg Leu Leu Leu Lys Asn Glu
20 25 30

Gln Thr Gln Val Lys Ile Gln Lys Phe Pro Tyr Tyr Asn Pro Val Gln
35 40 45

Asn Val Leu Ile Thr Ser Trp Phe Trp Ser His Arg Pro Ser His Ile
50 55 60

Glu Met Ala Gly Leu Lys Thr Asp Val Met Leu Ala Ala Tyr Gly Tyr
65 70 75 80

His Met Met Asp Val Gln Ile Val Asn Glu Val Val Gln Asp Lys Thr
85 90 95

Phe Lys His Pro Lys Phe Tyr Gln Gln Leu Phe Lys Leu Leu Glu Asp
100 105 110

Met Arg Val Leu Asn Ser Ile Lys Val Glu Arg Pro Ser Thr Ala Lys
115 120 125

Leu Ile Asp Leu Arg Leu Asp Thr Arg Ile Ser Tyr Thr Glu Ser Gln
130 135 140

Ile	Lys	Val	Tyr	Arg	Thr	Lys	Thr	Gln	Tyr	Thr	Asp	Leu	Leu	Phe	Leu	145	150	155	160
Tyr	Leu	Glu	His	Ala	Phe	Leu	Ser	Gln	Asp	Phe	Phe	Asp	Ile	Pro	Ser	165	170	175	
Ile	His	Ser	Asp	Leu	Asp	Asp	Ile	Leu	Val	Asn	Met	Phe	Leu	Tyr	Leu	180	185	190	
Pro	Asn	Phe	Phe	Gln	Asn	Gln	Asn	Ser	Glu	Asp	Asn	Met	Tyr	Leu	Ala	195	200	205	
Gln	Arg	Ile	Met	Tyr	Gln	Val	Asp	Asp	Ile	Leu	Lys	Glu	Asp	Met	Leu	210	215	220	
Asn	Glu	Tyr	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Lys	Thr	Leu	Tyr	Asn	Thr	Leu	Ala	Ser	225	230	235	240
Pro	Glu	Phe	Asp	Asp	Leu	Lys	Arg	Thr	Asp	Ala	Ser	Gln	Val	Asp	Gly	245	250	255	
Gln	Asp	Asp	Thr	Ser	Glu	Asp	Asp	Asp	Asn	Glu	Ser	Glu	Lys	Ala	Asp	260	265	270	
Ser	Lys	Ser	Ala	Asp	Ser	Glu	Ser	Lys	Gly	Gly	Ala	Tyr	Leu	Glu	Met	275	280	285	
Glu	Leu	His	Glu	Gly	Gln	Asn	Ser	Glu	Thr	Leu	Gly	Asn	Asp	Glu	Ala	290	295	300	
Arg	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Asp	Asp	Met	Thr	Asp	Met	Met	Thr	Lys	Lys	305	310	315	320
Gly	Lys	Gly	Ser	Asn	Asp	Thr	Leu	Asn	Arg	Glu	Glu	Gly	Asp	Ala	Val	325	330	335	
Gly	Gln	Ser	Gln	Ala	Phe	Gln	Leu	Asp	Gly	Val	Asn	Lys	Asn	Val	Glu	340	345	350	
Ile	Lys	Trp	Gln	Ile	Pro	Glu	Ile	Glu	Pro	Gln	Tyr	Val	Leu	Glu	Tyr	355	360	365	
Gln	Glu	Ser	Lys	Gln	Asp	Val	Gln	Tyr	Glu	Ile	Lys	Asp	Leu	Ile	Gln	370	375	380	
Ile	Ile	Lys	Lys	Thr	Ile	Glu	Arg	Glu	Gln	Arg	Asp	Ala	Arg	Phe	Asn	385	390	395	400

Leu Thr Lys Gly Arg Leu Gln Lys Asp Leu Ile Asn Trp Phe Ile Asp
 405 410 415
 Asp Gln Tyr Lys Leu Phe Tyr Lys Lys Gln Asp Leu Ser Lys Ser Phe
 420 425 430
 Asp Ala Thr Phe Thr Leu Leu Ile Asp Ala Ser Ala Ser Met His Asp
 435 440 445
 Lys Met Ala Glu Thr Lys Lys Gly Val Val Leu Phe His Glu Thr Leu
 450 455 460
 Lys Ala Leu Asn Ile Lys His Glu Ile Leu Ser Phe Ser Glu Asp Ala
 465 470 475 480
 Phe Asp Ser Asp Glu His Ala Gln Pro Asn Ile Ile Asn Glu Ile Ile
 485 490 495
 Asn Tyr Asp Tyr Ser Thr Phe Glu Lys Asp Gly Pro Arg Ile Met Ala
 500 505 510
 Leu Glu Pro Gln Asp Asp Asn Arg Asp Gly Val Ala Ile Arg Val Ala
 515 520 525
 Ser Glu Arg Leu Met Arg Arg Asn Gln His Gln Arg Phe Leu Ile Val
 530 535 540
 Phe Ser Asp Gly Glu Pro Ser Ala Phe Asn Tyr Ser Gln Asp Gly Ile
 545 550 555 560
 Ile Asp Thr Tyr Glu Ala Val Glu Met Ser Arg Lys Phe Gly Ile Glu
 565 570 575
 Val Phe Asn Val Phe Leu Ser Gln Asp Pro Ile Thr Glu Asp Val Glu
 580 585 590
 Gln Thr Ile His Asn Ile Tyr Gly Gln Tyr Ala Ile Phe Val Glu Gly
 595 600 605
 Val Ala His Leu Pro Gly His Leu Ser Pro Leu Leu Lys Lys Leu Leu
 610 615 620
 Leu Lys Ser Leu
 625

ES 2 563 646 T3

<210> 30
 <211> 154
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.

5

<400> 30

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

Asn Asn Gly Ile Ala Val Leu Glu Gln Asp Val Ile Thr Pro Thr Val
 20 25 30

Lys Pro Gln Ala Lys Gln Asp Ile Ile Gln Ala Val Thr Thr Arg Lys
 35 40 45

Gln Gln Ile Lys Lys Ser Asn Ala Ser Leu Gln Asp Glu Lys Asp Val
 50 55 60

Ala Asn Asp Lys Ile Gly Lys Ile Glu Thr Lys Ala Ile Lys Asp Ile
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Thr Asn Ala Gln Val Glu Ala Ile Lys Thr Lys Ala
 85 90 95

Ile Asn Asp Ile Asn Gln Thr Thr Pro Ala Thr Thr Ala Lys Ala Ala
 100 105 110

Ala Leu Glu Glu Phe Asp Glu Val Val Gln Ala Gln Ile Asp Gln Ala
 115 120 125

Pro Leu Asn Pro Asp Thr Thr Asn Glu Glu Val Ala Glu Ala Ile Glu
 130 135 140

Arg Ile Asn Ala Ala Lys Val Ser Gly Val
 145 150

10

<210> 31
 <211> 584
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.

15

<400> 31

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

Ala Ser Thr Gly Ala Asn Phe Asn Asn Asn Glu Ala Ser Ala Ala Ala
20 25 30

Lys Pro Leu Asp Lys Ser Ser Ser Ser Leu His His Gly Tyr Ser Lys
35 40 45

Val His Val Pro Tyr Ala Ile Thr Val Asn Gly Thr Ser Gln Asn Ile
50 55 60

ES 2 563 646 T3

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

325								330				335			
Lys	Arg	Ile	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Lys	Asn	Tyr	Thr	Ala	Asn	Leu	Val
			340					345					350		
His	Ala	Lys	Asp	Val	Lys	Arg	Ile	Glu	Ile	Thr	Val	Lys	Thr	Gly	Thr
		355					360					365			
Lys	Ala	Lys	Ala	Asp	Arg	Tyr	Val	Pro	Tyr	Thr	Ile	Ala	Val	Asn	Gly
	370					375					380				
Thr	Ser	Thr	Pro	Ile	Leu	Ser	Asp	Leu	Lys	Phe	Thr	Gly	Asp	Pro	Arg
385					390					395					400
Val	Gly	Tyr	Lys	Asp	Ile	Ser	Lys	Lys	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Lys	His
				405				410						415	
Asp	Arg	Gly	Ile	Gly	Glu	Arg	Glu	Leu	Lys	Tyr	Ala	Lys	Lys	Ala	Thr
			420					425					430		
Tyr	Thr	Val	His	Phe	Lys	Asn	Gly	Thr	Lys	Lys	Val	Ile	Asn	Ile	Asn
		435					440					445			
Ser	Asn	Ile	Ser	Gln	Leu	Asn	Leu	Leu	Tyr	Val	Gln	Asp	Ile	Lys	Lys
	450					455					460				
Ile	Asp	Ile	Asp	Val	Lys	Thr	Gly	Thr	Lys	Ala	Lys	Ala	Asp	Ser	Tyr
465					470					475					480
Val	Pro	Tyr	Thr	Ile	Ala	Val	Asn	Gly	Thr	Ser	Thr	Pro	Ile	Leu	Ser
				485					490					495	
Lys	Leu	Lys	Ile	Ser	Asn	Lys	Gln	Leu	Ile	Ser	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Asn
			500					505					510		
Asp	Lys	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Lys	Ser	Glu	Arg	Gly	Ile	Ser	Asp	Leu
		515					520					525			
Asp	Leu	Lys	Phe	Ala	Lys	Gln	Ala	Lys	Tyr	Thr	Val	Tyr	Phe	Lys	Asn
	530					535					540				
Gly	Lys	Lys	Gln	Val	Val	Asn	Leu	Lys	Ser	Asp	Ile	Phe	Thr	Pro	Asn
545					550					555					560
Leu	Phe	Ser	Ala	Lys	Asp	Ile	Lys	Lys	Ile	Asp	Ile	Asp	Val	Lys	Gln
				565					570					575	
Tyr	Thr	Lys	Ser	Lys	Lys	Asn	Lys								
			580												

<210> 32
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus sp.

5

<400> 32

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

Asp Leu Glu Thr Ile Ile Asp Glu Phe Phe Ser Asp Ile Asp Lys Thr
 225 230 235 240
 Arg Pro Asn Asn Ile Pro Val Leu Glu Asp Glu Lys Gln Glu Glu Lys
 245 250 255
 Asn His Lys Asn Met Ala Gln Leu Lys Ser Asp Thr Glu Ala Ala Lys
 260 265 270
 Ser Asp Glu Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser Leu Asn Thr
 275 280 285
 Gln Asn His Lys Pro Ala Ser Gln Glu Val Ser Glu Gln Gln Lys Ala
 290 295 300
 Glu Tyr Asp Lys Arg Ala Glu Glu Arg Lys Ala Arg Phe Leu Asp Asn
 305 310 315 320
 Gln Lys Ile Lys Lys Thr Pro Val Val Ser Leu Glu Tyr Asp Phe Glu
 325 330 335
 His Lys Gln Arg Ile Asp Asn Glu Asn Asp Lys Lys Leu Val Val Ser
 340 345 350
 Ala Pro Thr Lys Lys Pro Thr Ser Pro Thr Thr Tyr Thr Glu Thr Thr
 355 360 365
 Thr Gln Val Pro Met Pro Thr Val Glu Arg Gln Thr Gln Gln Gln Ile
 370 375 380
 Ile Tyr Asn Ala Pro Lys Gln Leu Ala Gly Leu Asn Gly Glu Ser His
 385 390 395 400
 Asp Phe Thr Thr Thr His Gln Ser Pro Thr Thr Ser Asn His Thr His
 405 410 415
 Asn Asn Val Val Glu Phe Glu Glu Thr Ser Ala Leu Pro Gly Arg Lys
 420 425 430
 Ser Gly Ser Leu Val Gly Ile Ser Gln Ile Asp Ser Ser His Leu Thr
 435 440 445
 Glu Arg Glu Lys Arg Val Ile Lys Arg Glu His Val Arg Glu Ala Gln
 450 455 460
 Lys Leu Val Asp Asn Tyr Lys Asp Thr His Ser Tyr Lys Asp Arg Ile
 465 470 475 480
 Asn Ala Gln Gln Lys Val Asn Thr Leu Ser Glu Gly His Gln Lys Arg

485

490

495

Phe Asn Lys Gln Ile Asn Lys Val Tyr Asn Gly Lys
500 505

<210> 33

5 <211> 520

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 33

10

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

Leu Leu Ser Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Ala
 210 215 220
 Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
 225 230 235 240
 His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
 245 250 255
 Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys
 260 265 270
 Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys
 275 280 285
 Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr
 290 295 300
 Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser
 305 310 315 320
 Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
 325 330 335
 Ala Pro Lys Glu Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn
 340 345 350
 Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys
 355 360 365
 Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn
 370 375 380
 Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Lys
 385 390 395 400
 Lys Pro Gly Lys Glu Asp Asn Asn Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn
 405 410 415
 Lys Pro Gly Lys Glu Asp Gly Asn Gly Val His Val Val Lys Pro Gly
 420 425 430
 Asp Thr Val Asn Asp Ile Ala Lys Ala Asn Gly Thr Thr Ala Asp Lys
 435 440 445
 Ile Ala Ala Asp Asn Lys Leu Ala Asp Lys Asn Met Ile Lys Pro Gly
 450 455 460

ES 2 563 646 T3

Gln Glu Leu Val Val Asp Lys Lys Gln Pro Ala Asn His Ala Asp Ala
465 470 475 480

Asn Lys Ala Gln Ala Leu Pro Glu Thr Gly Glu Glu Asn Pro Phe Ile
485 490 495

Gly Thr Thr Val Phe Gly Gly Leu Ser Leu Ala Leu Gly Ala Ala Leu
500 505 510

Leu Ala Gly Arg Arg Arg Glu Leu
515 520

<210> 34

<211> 291

<212> PRT

<213> Staphylococcus sp.

<400> 34

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

Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Lys Lys Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
180 185 190

His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
195 200 205

Leu Lys Ala Ala Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys
210 215 220

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys
225 230 235 240

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

Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Ala Ala Pro Ser
260 265 270

Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln
275 280 285

Ala Pro Lys
290

5 <210> 35
<211> 34
<212> ADN
<213> Staphylococcus sp.

10 <400> 35
gctgcacata tggcgcaaca cgatgaagct caac 34

15 <210> 36
<211> 30
<212> ADN
<213> Staphylococcus sp.

20 <400> 36
agtggatcct tatgctttgt tagcatctgc 30

25 <210> 37
<211> 19
<212> PRT
<213> Staphylococcus sp.

<400> 37

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser

5 <210> 38
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 38
 10 aacatatgtt caacaaagat caacaaagc 29
 <210> 39
 <211> 29
 15 <212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 39
 20 aaggatccag attcgtttaa ttttttagc 29
 <210> 40
 <211> 43
 <212> ADN
 25 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 40
 30 cttcattcaa agtcttaaag cgcgcccaag ccaaagcact aac 43
 <210> 41
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.
 35 <400> 41
 gttagtgcct tggcttgggg cggctttaag actttgaatg aag 43
 <210> 42
 40 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 42
 45 catatgttca acaaagataa aaaaagcgcc ttctatgaaa tc 42
 <210> 43
 <211> 42
 50 <212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 43
 55 gatttcatag aaggcgcttt ttttatcttt gttgaacata tg 42
 <210> 44
 <211> 42
 <212> ADN
 60 <213> Staphylococcus sp.

	<400> 44		
	catatgttca acaaagatgg aggaagcgcc ttctatgaaa tc	42	
5	<210> 45 <211> 42 <212> ADN <213> Staphylococcus sp.		
10	<400> 45		
	gatttcatag aaggcgcttc ctccatcttt gttgaacata tg	42	
15	<210> 46 <211> 52 <212> ADN <213> Staphylococcus sp.		
20	<400> 46		
	ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctg atgactaagt tgaaaaaaga ag	52	
25	<210> 47 <211> 28 <212> ADN <213> Staphylococcus sp.		
	<400> 47		
30	aaggatcccc tccaaaatgt aattgccc	28	
35	<210> 48 <211> 30 <212> ADN <213> Staphylococcus sp.		
	<400> 48		
40	aaggatccgt ttgtaactct atccaaagac	30	
45	<210> 49 <211> 49 <212> ADN <213> Staphylococcus sp.		
	<400> 49		
	ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg acacctattg cacgattcg	49	
50	<210> 50 <211> 50 <212> ADN <213> Staphylococcus sp.		
55	<400> 50		
	ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc agatagcgat tcagattcag	50	
60	<210> 51 <211> 31 <212> ADN <213> Staphylococcus sp.		
65	<400> 51		
	aaggatccct gtattttctc cttattttc c	31	

<210> 52
 <211> 30
 <212> ADN
 5 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 52
 aaggatccca tggctgcaaa gcaaataatg 30
 10 <210> 53
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.
 15 <400> 53
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg ccctggtgta acaaattat g 51
 20 <210> 54
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.
 25 <400> 54
 gaaggatccg ttattctag ttaatatata gttaatg 37
 30 <210> 55
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.
 35 <400> 55
 gaactgcagc tgtatgtctt tggatagagt tac 33
 40 <210> 56
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 56
 45 gaaggatccg gtggcttttt tacttggtt ttc 33
 <210> 57
 <211> 33
 <212> ADN
 50 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 57
 gaactgcagc gacaaactca ttattgctt tgc 33
 55 <210> 58
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.
 60 <400> 58
 gaactcgagt ctagcttatt tacatgg 27
 65 <210> 59
 <211> 45

<212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 59
 5 gaactcgaga tagaaggcag aatagtaaca aaggattata gtggg 45
 <210> 60
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 60
 15 gtaggatcct gggatagagt taaaaac 27
 <210> 61
 <211> 34
 <212> ADN
 20 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 61
 25 gaactcgagg cattatgtgt atcacaatt tggg 34
 <210> 62
 <211> 43
 <212> ADN
 30 <213> Staphylococcus sp.
 <400> 62
 gaactcgaga tagaaggcag agtggttct ggggagaaga atc 43
 35 <210> 63
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Staphylococcus sp.
 40 <400> 63
 gaactcgagg cagccatgca ttaattattt gcc 33

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido inmunogénico aislado que comprende un dominio D de la variante de la Proteína A (SpA) que tiene (a) al menos dos sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a Fc, que comprende una sustitución de aminoácido en cada una de las posiciones de aminoácidos que corresponde a las posiciones de aminoácidos 9 y 10 de SEQ ID NO:2 y (b) al menos dos sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a VH3, que comprende una sustitución de aminoácidos en cada una de las posiciones correspondientes a las posiciones de aminoácidos 36 y 37 de SEQ ID NO:2 y (c) una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.
- 10 2. Polipéptido según la reivindicación 1, en donde para (a) la sustitución de aminoácidos es un residuo de lisina por un residuo de glutamina.
3. Polipéptido según la reivindicación 1, en donde para (a) la sustitución de aminoácidos es un residuo de glicina por un residuo de glutamina.
4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde para (b) la sustitución de aminoácidos es un residuo de alanina por un residuo de aspartato.
- 15 5. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, con una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% o un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.
6. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que además comprende:
 - (i) una o más variantes de un dominio E, dominio A, dominio B, o dominio C de la SpA;
 - (ii) dos o más segmentos de dominio D; o
 - 20 (iii) un segmento que no es de la proteína A, preferiblemente un segundo segmento antigénico; en donde el segundo segmento antigénico es opcionalmente un segmento de un antígeno estafilocócico, preferiblemente, un segmento Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, EsaB, Coa, vWbp, vWh, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB, y/o SasF.
- 25 7. Composición inmunogénica que comprende un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en una composición farmacéuticamente aceptable.
8. Composición según la reivindicación 7, que además comprende:
 - (a) al menos un segundo antígeno estafilocócico; preferiblemente en donde el segundo antígeno se selecciona de un péptido EsaB, Emp, EsxA, EsxB, EsaC, Eap, Ebh, Coa, vWbp, vWh, Hla, SdrC, SdrD, SdrE, IsdA, IsdB, IsdC, ClfA, ClfB, y/o SasF; o
 - 30 (b) un adyuvante, preferiblemente en donde la variante de SpA se acopla a un adyuvante.
9. Composición según la reivindicación 7 u 8, que además comprende un polisacárido u oligosacárido PIA; un polisacárido capsular de tipo V y/o tipo VIII; o un oligosacárido de *S. aureus*.
10. Composición de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde un polisacárido capsular estafilocócico se conjuga a una proteína transportadora, preferiblemente, en donde la proteína transportadora se selecciona del grupo que consiste en toxoide tetánico, toxoide diftérico, CRM 197, proteína D de *Haemophilus influenzae*, pneumolisina y toxoide alfa.
- 35 11. Vacuna que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 7-10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
12. Molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia que codifica para el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 40 13. Método para la preparación de una vacuna que comprende los pasos de mezclar antígenos para realizar la composición de cualquiera de las reivindicaciones 7-10 y añadir un excipiente farmacéuticamente aceptable.

14. Composición para su uso en provocar una respuesta inmune contra una bacteria staphylococcus en un sujeto que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-10.

5 15. Composición para su uso en provocar una respuesta inmune contra una bacteria staphylococcus en un sujeto según la reivindicación 14:

(a) donde al sujeto se le administra también un adyuvante;

(b) en donde la bacteria staphylococcus es una bacteria *S. aureus*;

(c) en donde la bacteria staphylococcus es resistente a uno o más tratamientos, preferiblemente en donde la bacteria staphylococcus es resistente a la meticilina;

10 (d) en donde la composición se administra más de una vez al sujeto;

(e) en donde la composición se administra por vía oral, parenteral, subcutánea, intramuscular, o intravenosa;

(f) en donde la composición comprende un recombinante, una bacteria no staphylococcus que expresa la variante de SpA, preferiblemente la bacteria no staphylococcus recombinante es una Salmonella;

15 (g) en donde el sujeto es un mamífero, preferiblemente un humano;

(h) en donde la respuesta inmune es una respuesta inmune protectora; o

(i) en donde se sospecha que el sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar una infección estafilocócica; preferiblemente en donde se diagnostica al sujeto con una infección estafilocócica persistente.

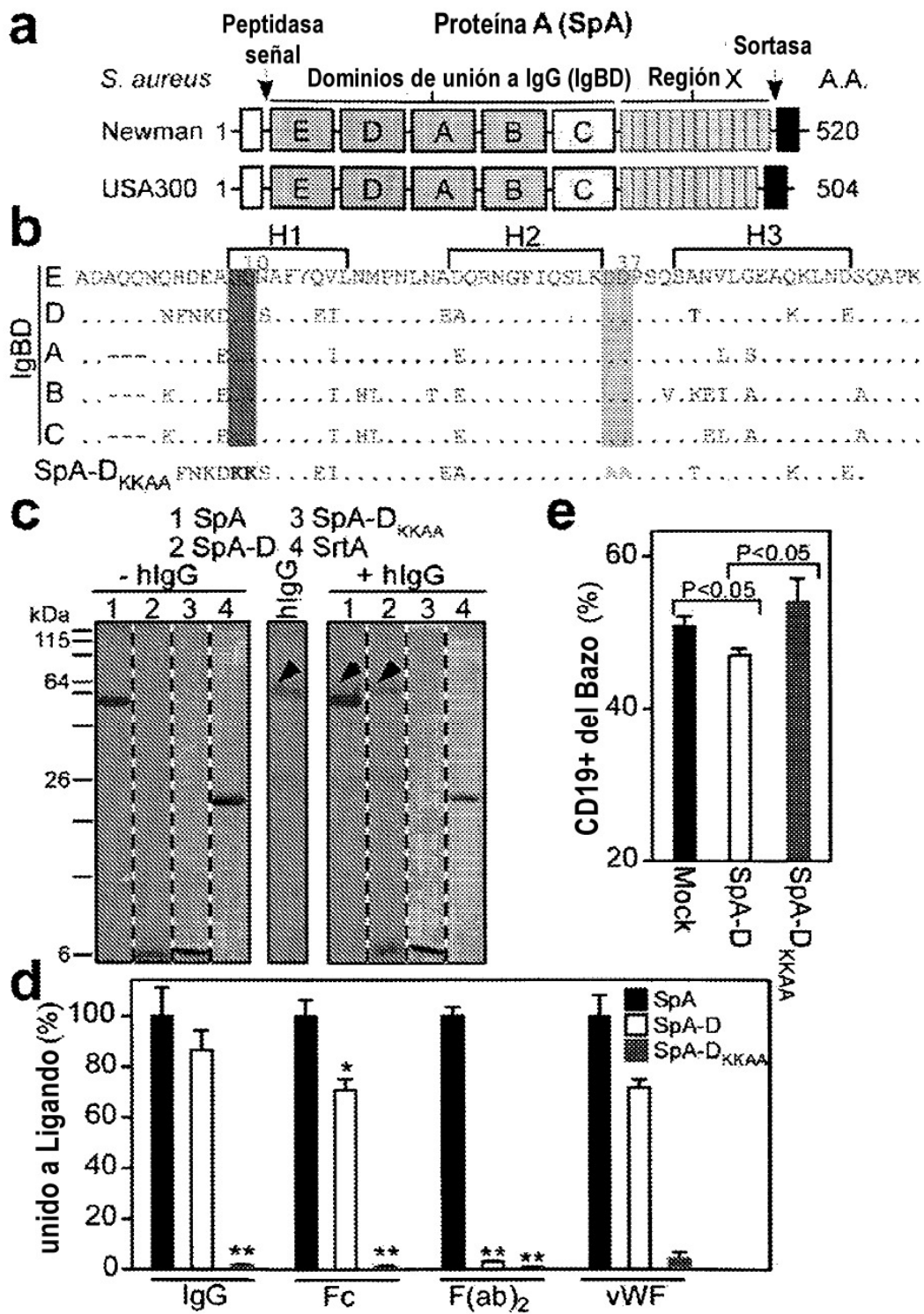


FIG. 1

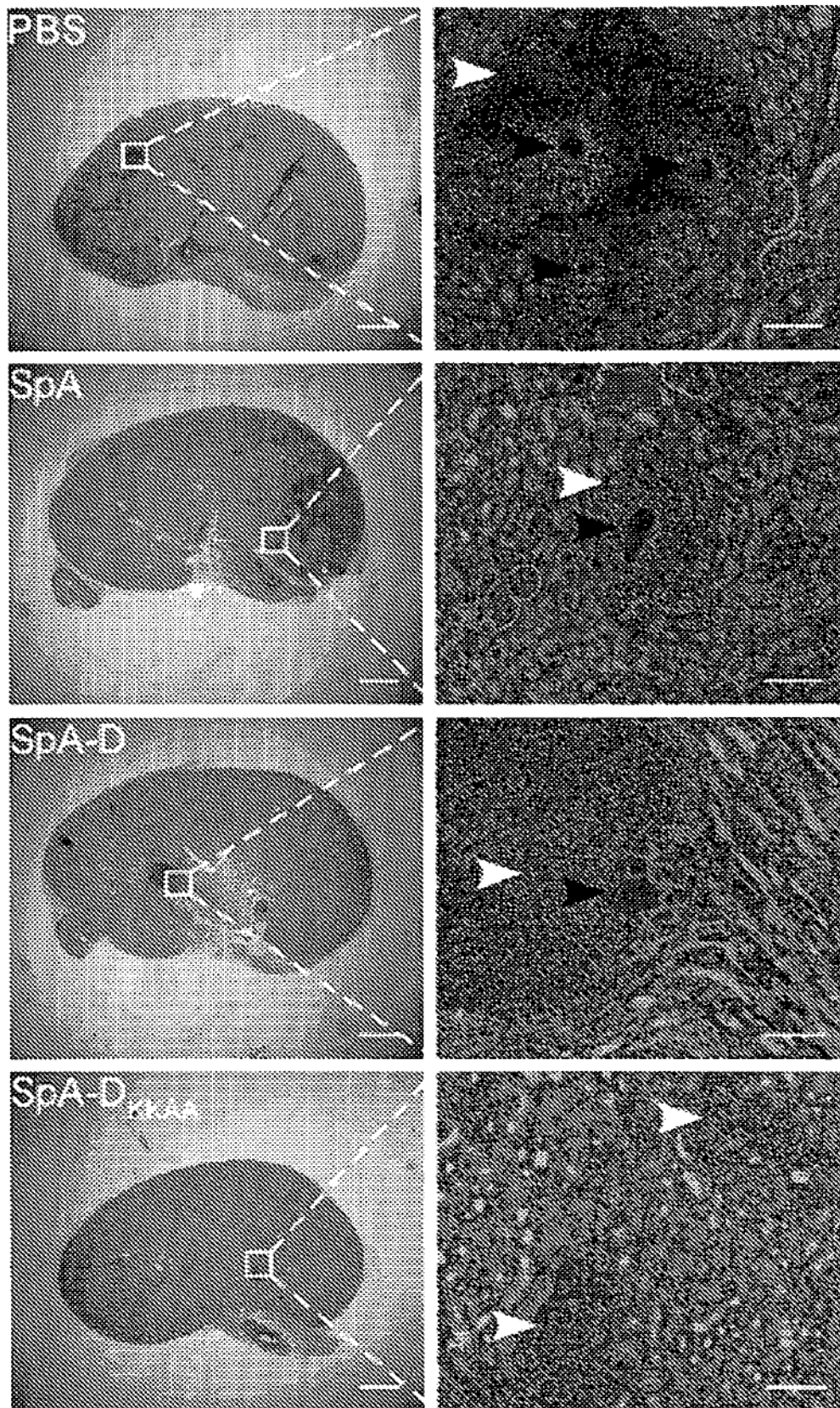


FIG. 2

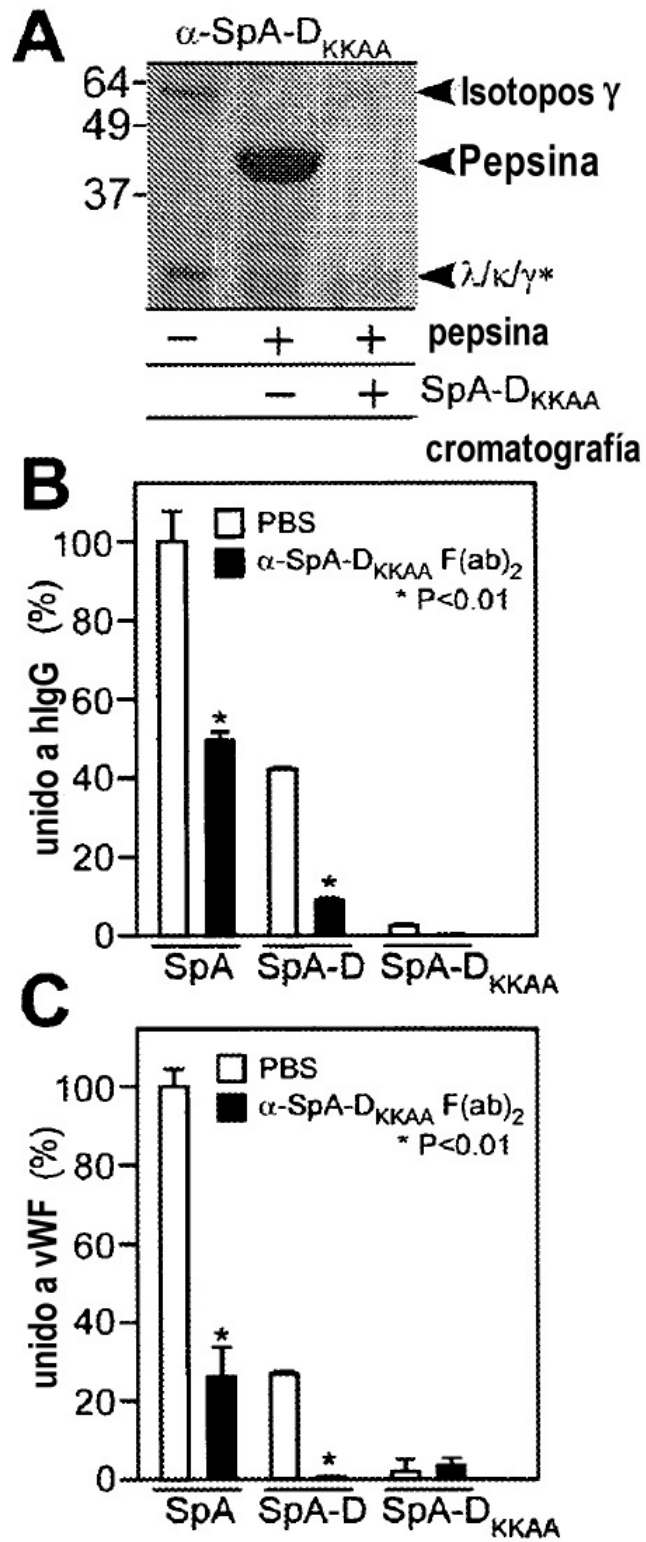


FIG. 3

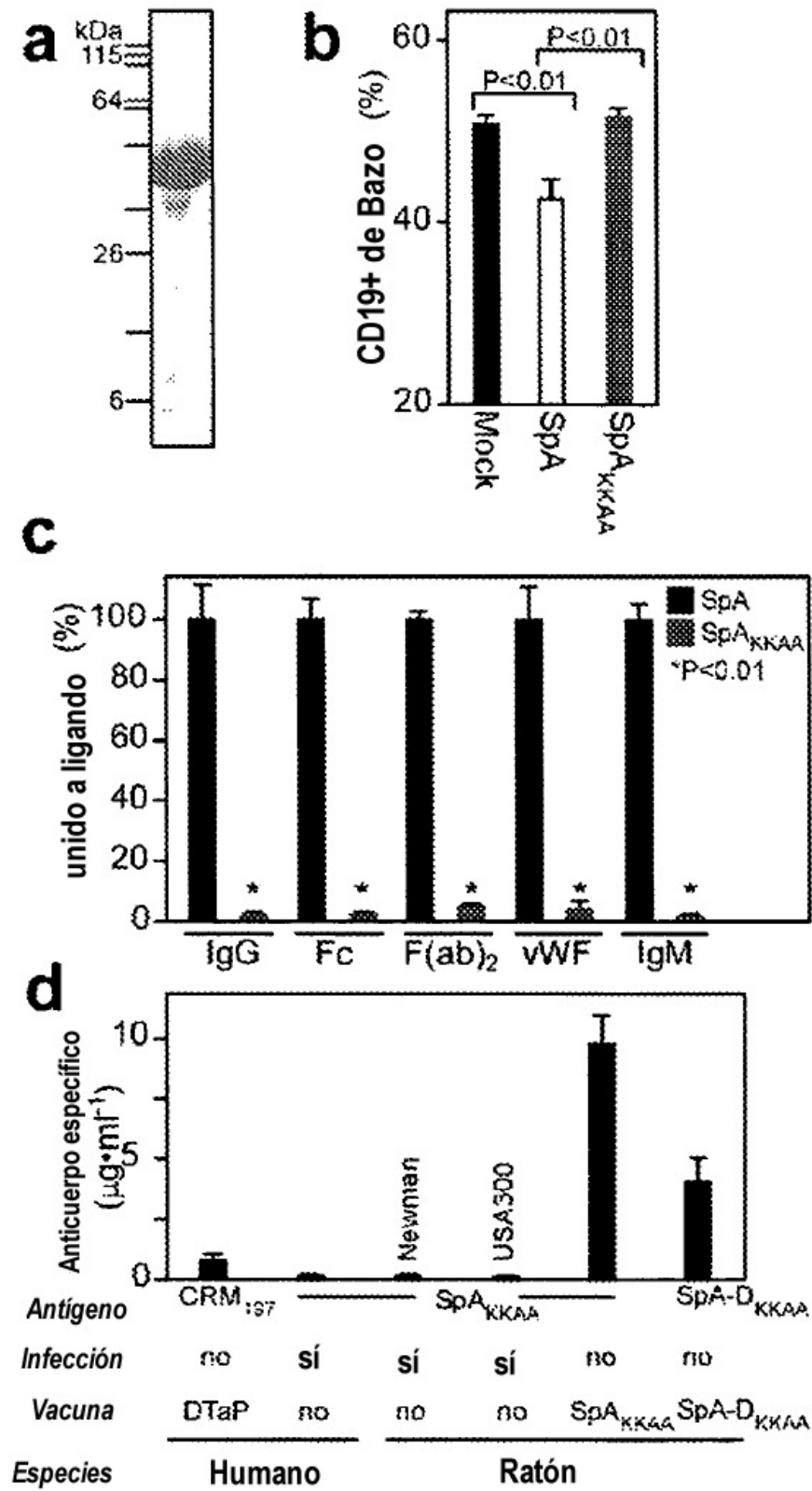


FIG. 4

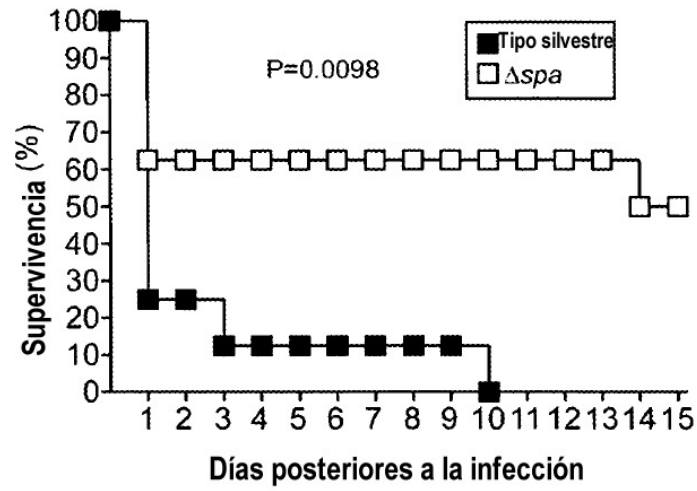


FIG. 5

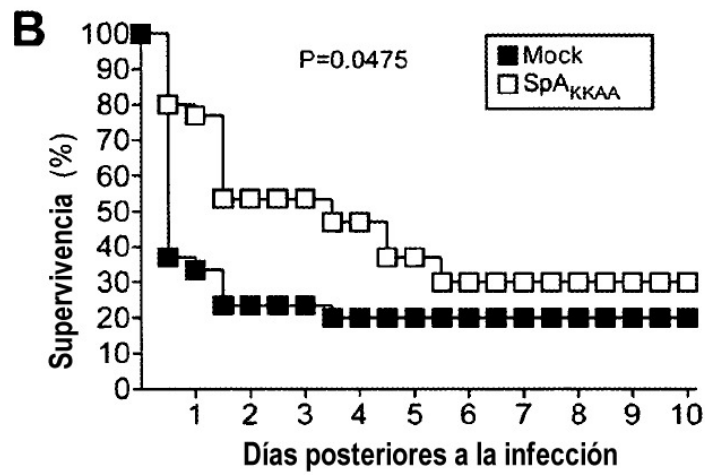
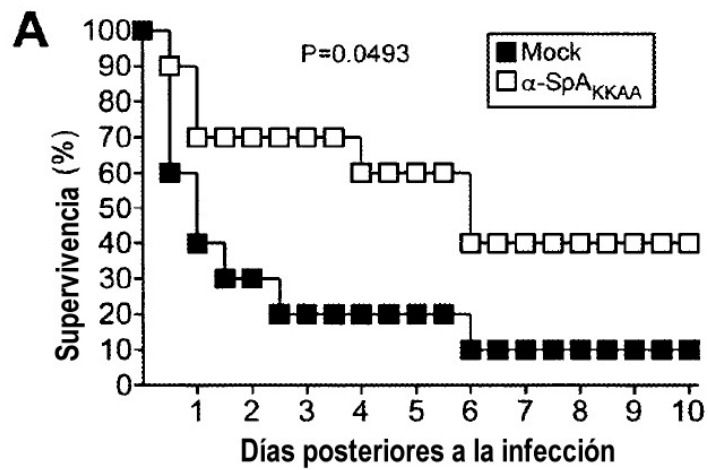


FIG. 6

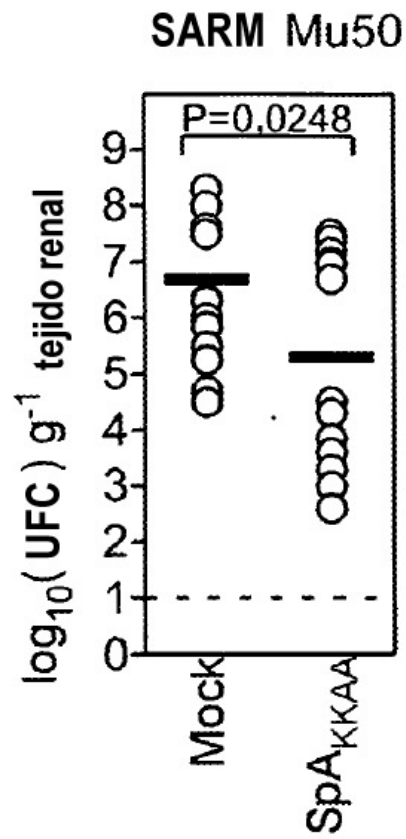


FIG. 7

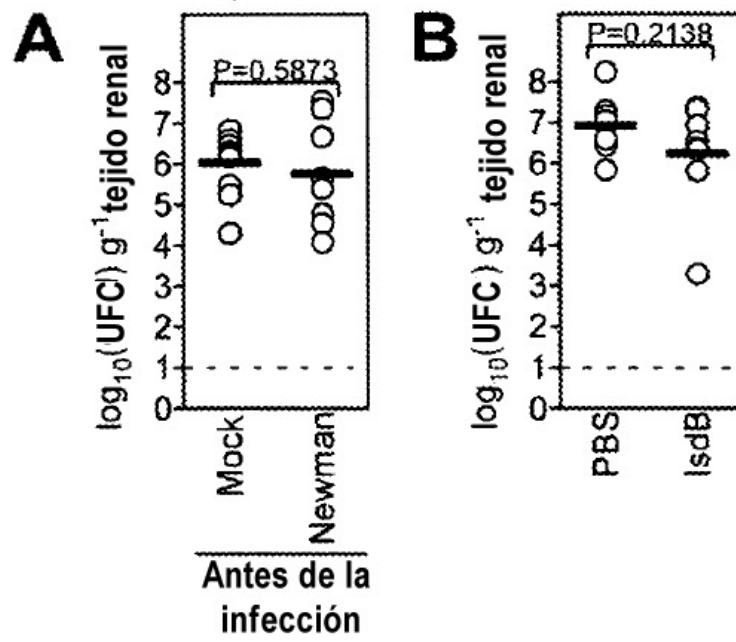


FIG. 8

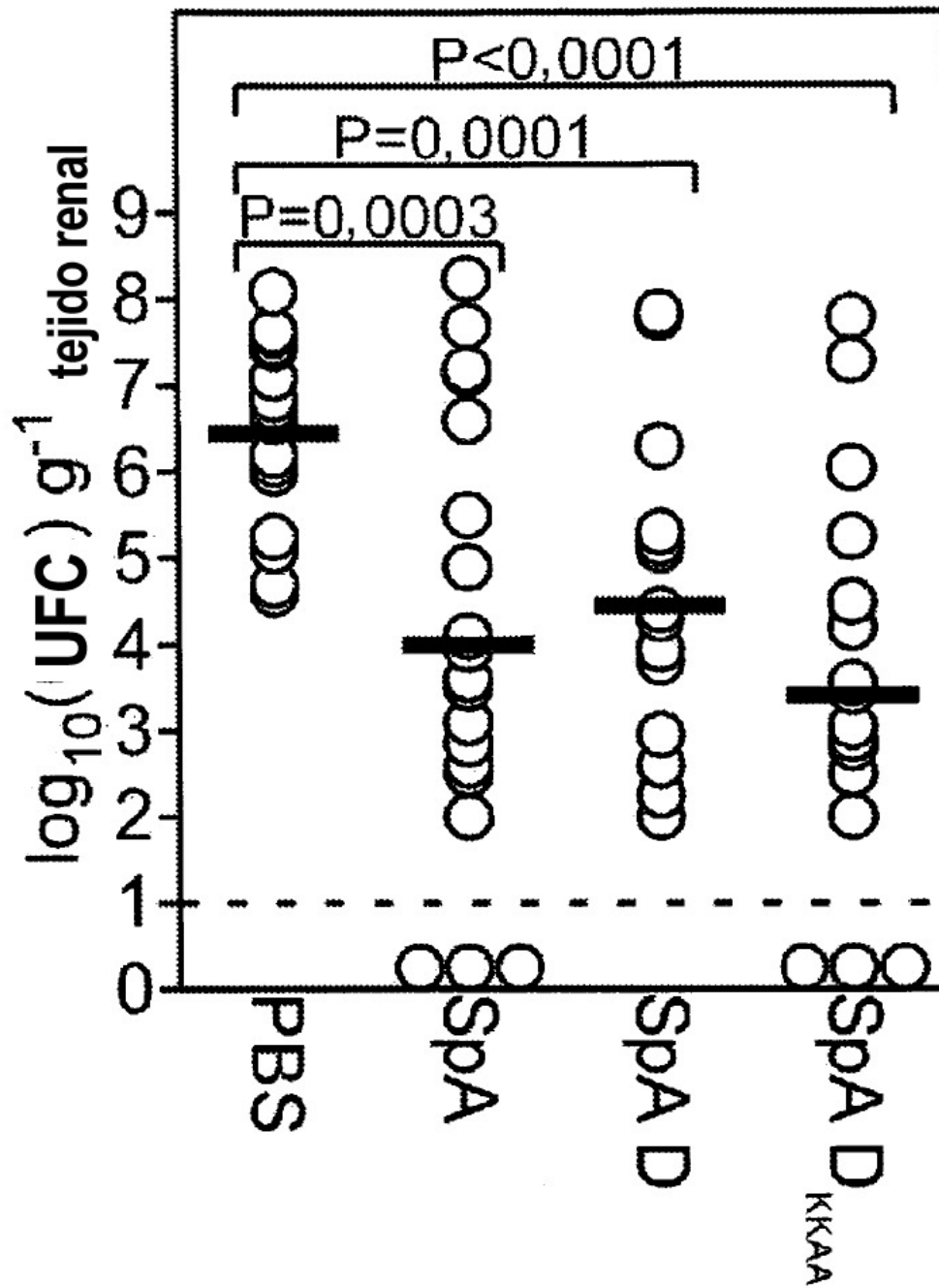


FIG. 9

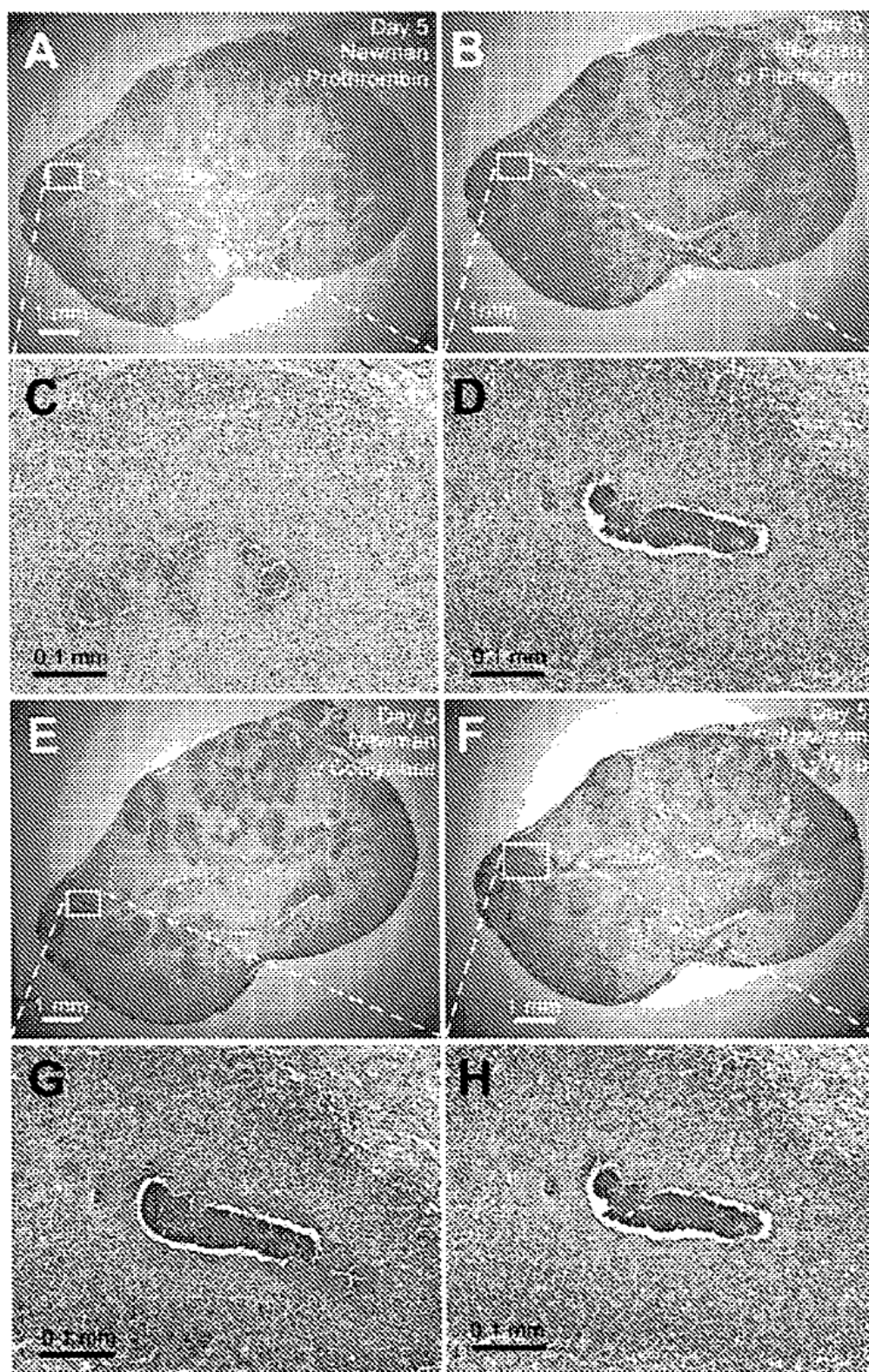
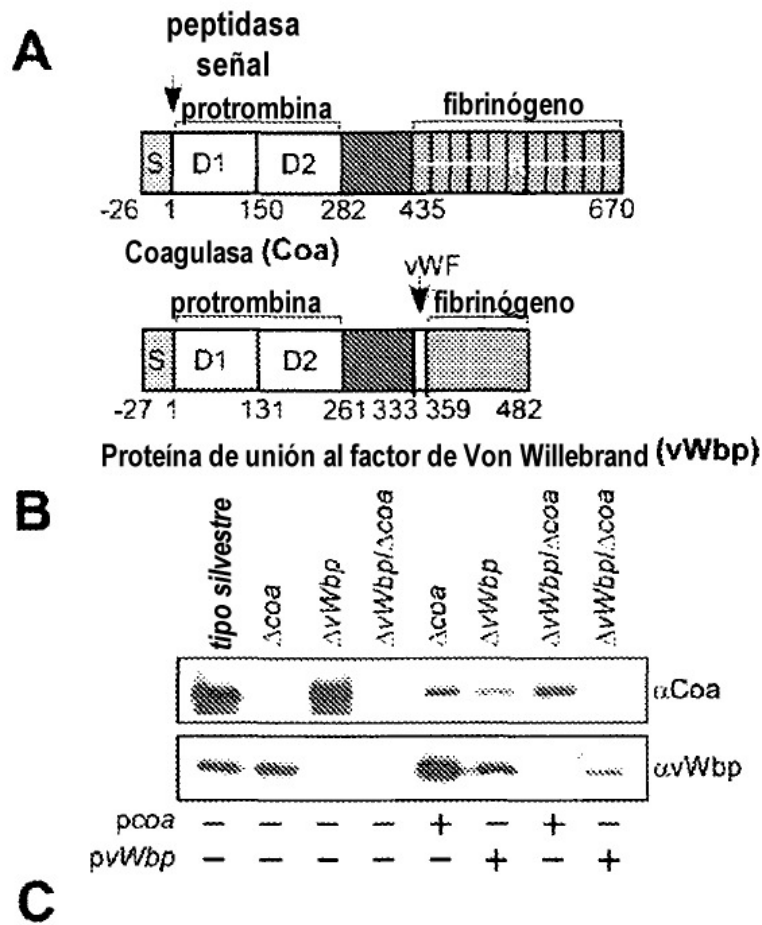


FIG. 10



Infección por S. aureus de sangre de ratón tratada con lepidurina

Cepa <i>S. aureus</i>	24 horas	Coagulación (horas)
Mock	—	>48
Newman		<12
ΔvWbp		24
Δcoa		36
ΔvWbp/Δcoa		>48
ΔvWbp/Δcoa + pvWbp		<12
ΔvWbp/Δcoa + pcoa		24
ΔvWbp + pvWbp		36
Δcoa + pcoa		24

FIG. 11

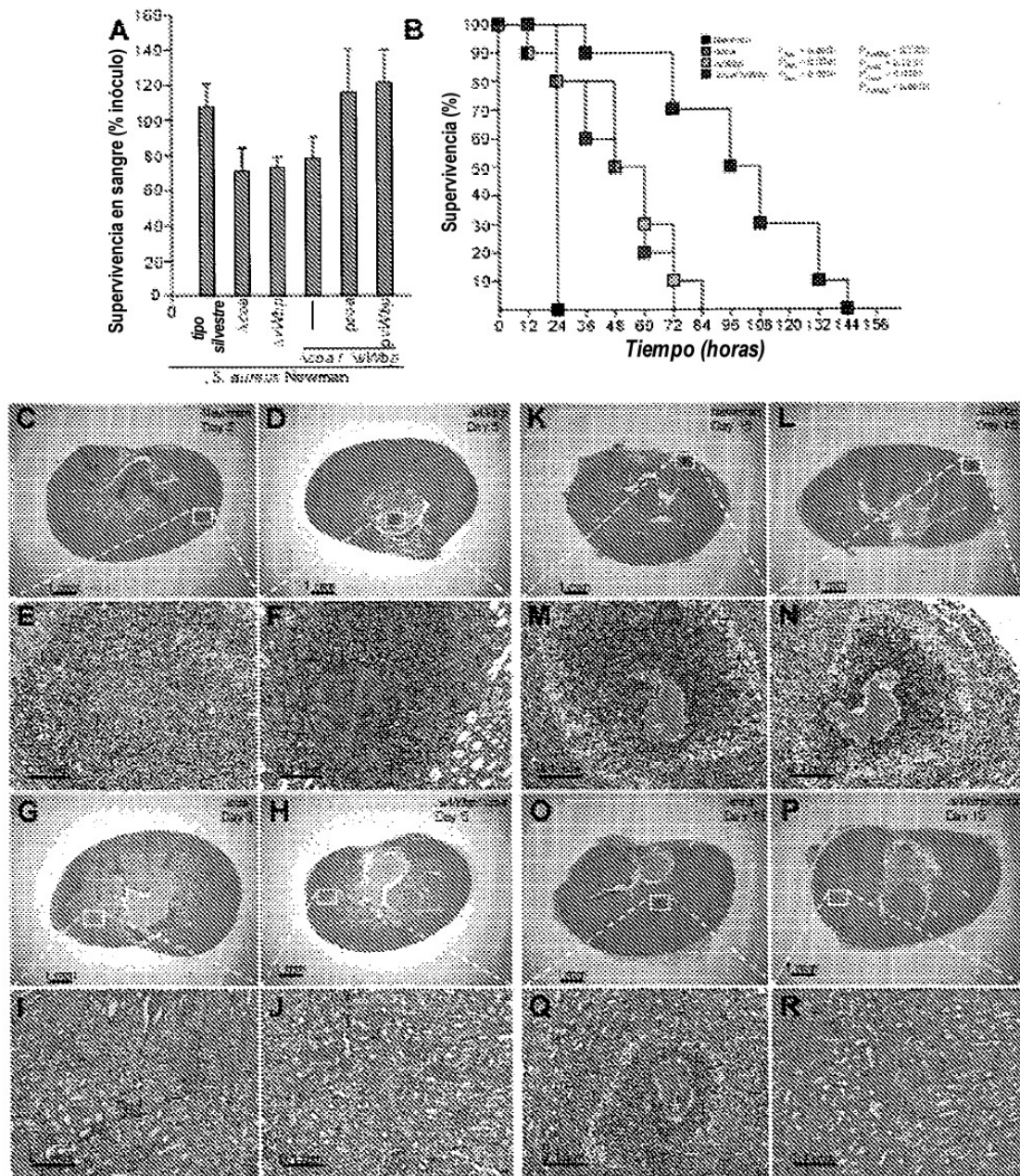


FIG. 12

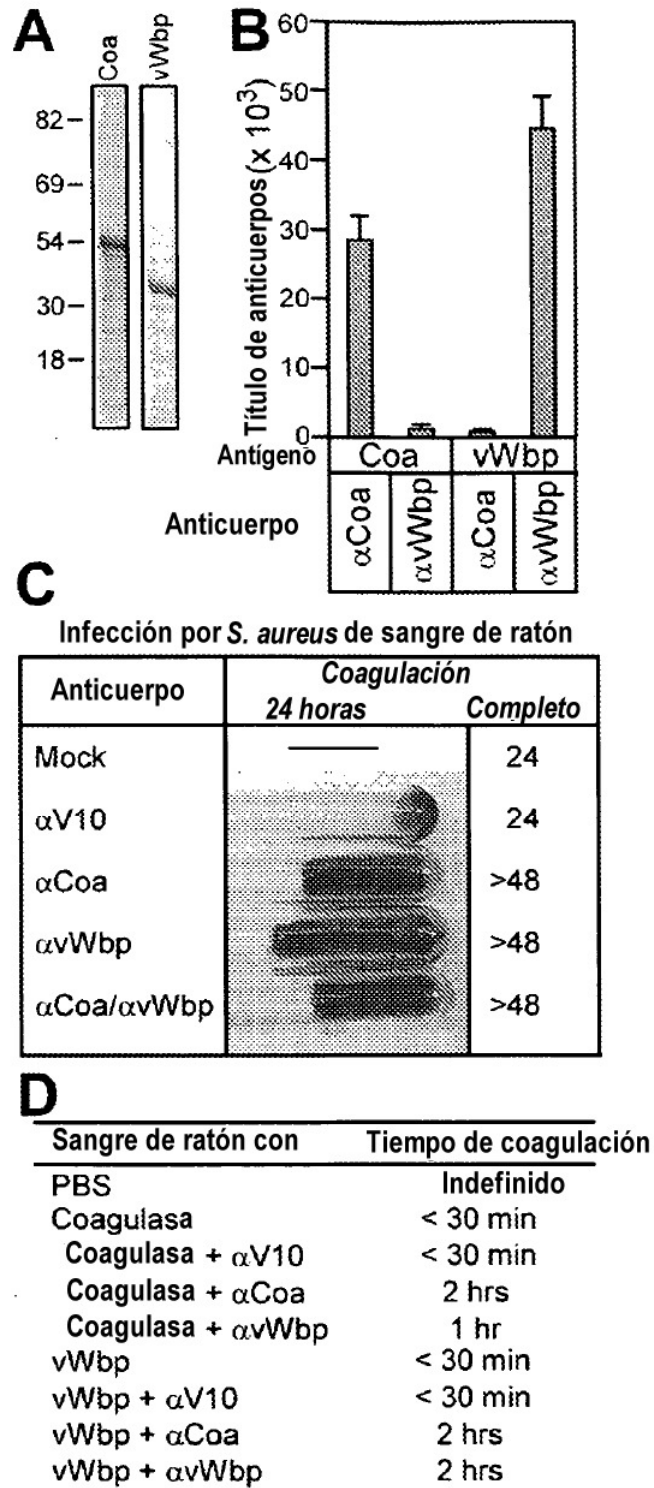


FIG. 13

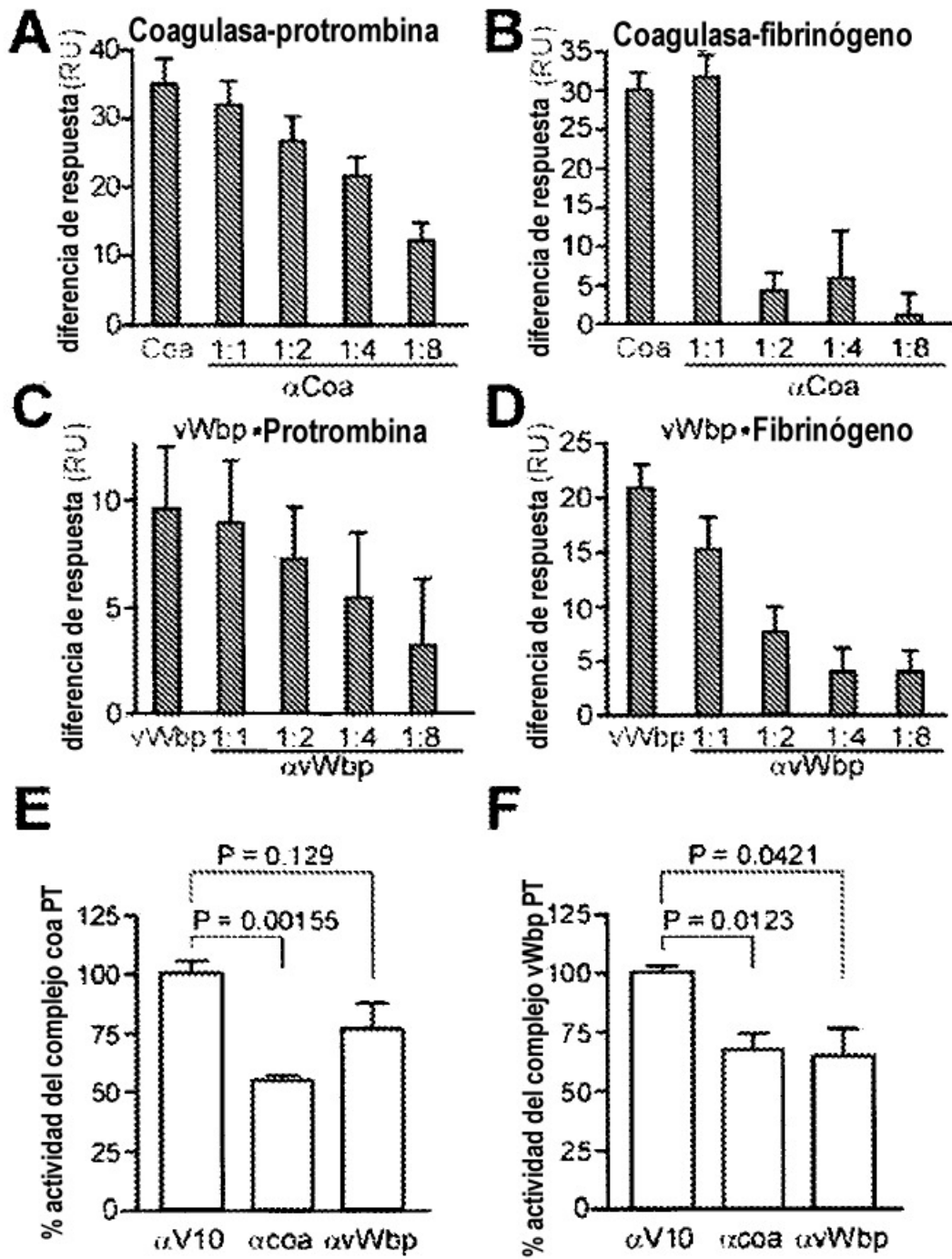


FIG. 14

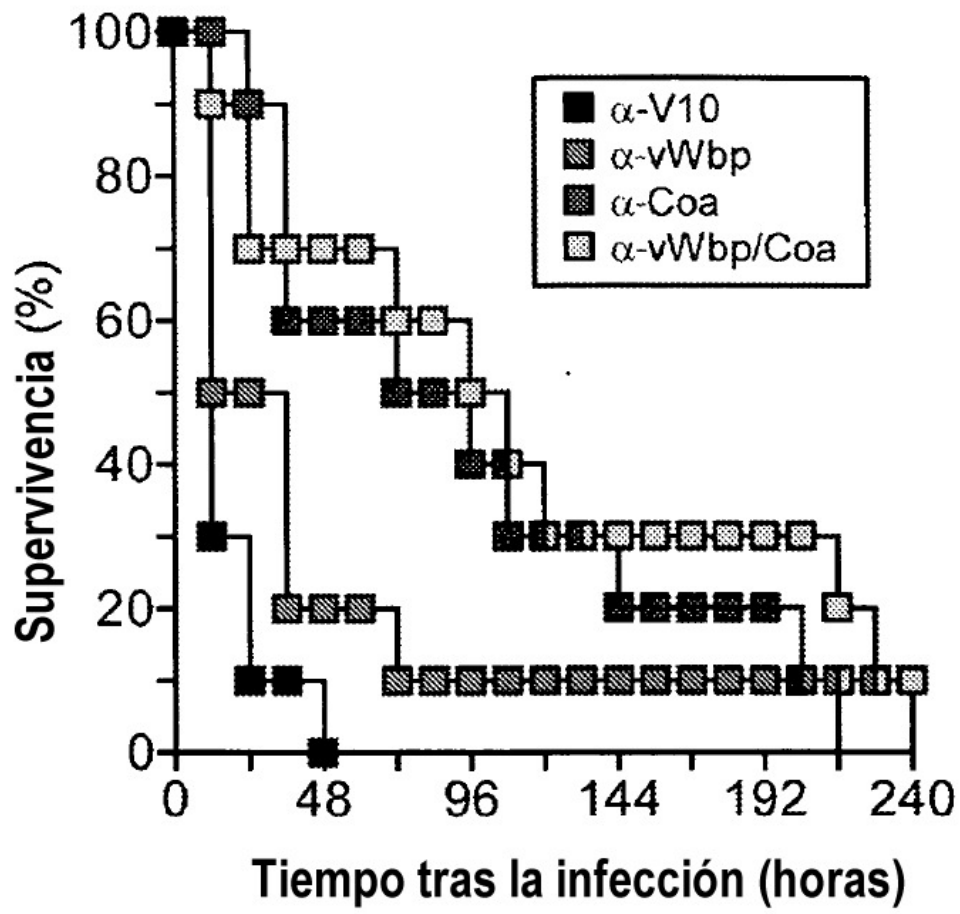


FIG. 15

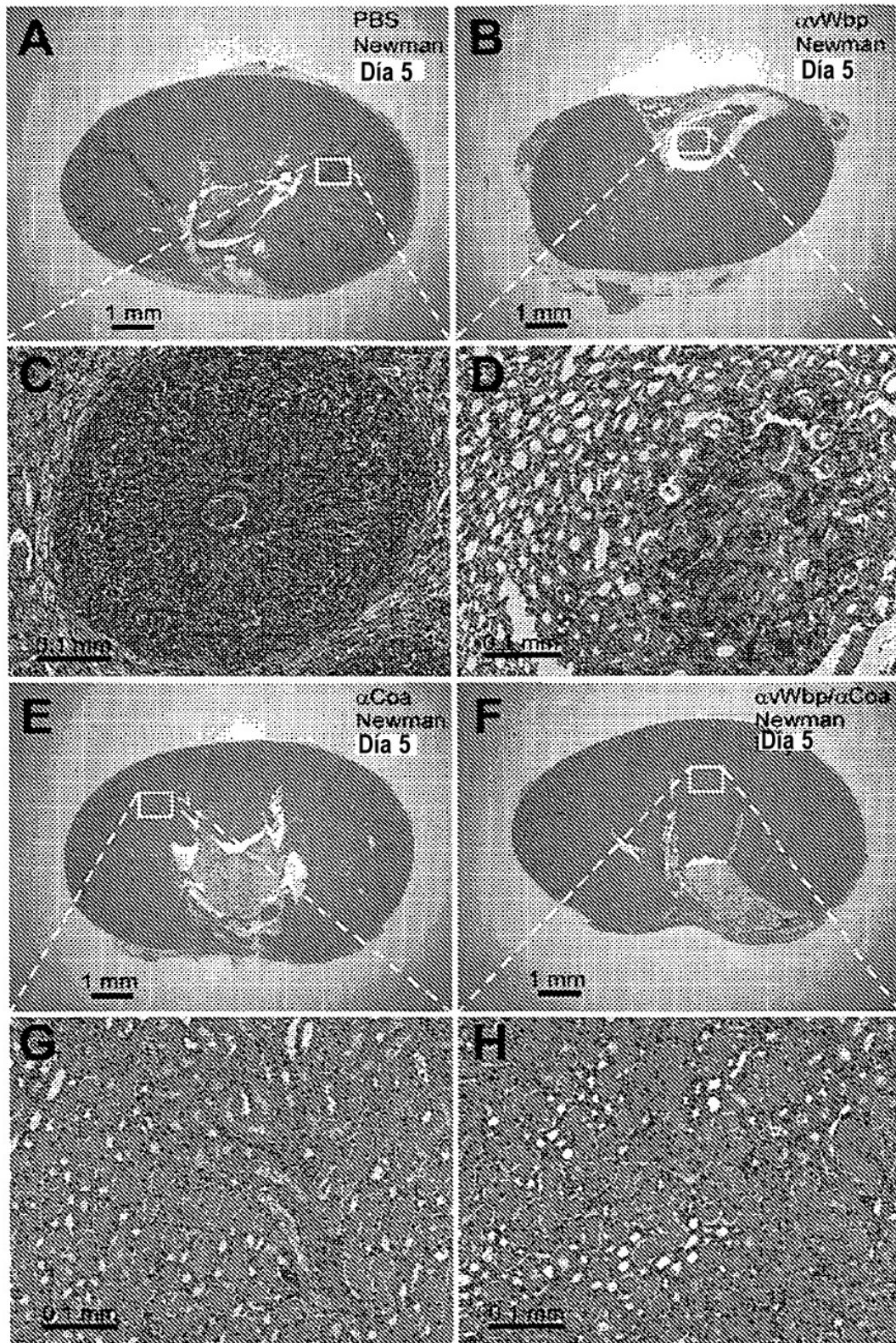


FIG. 16

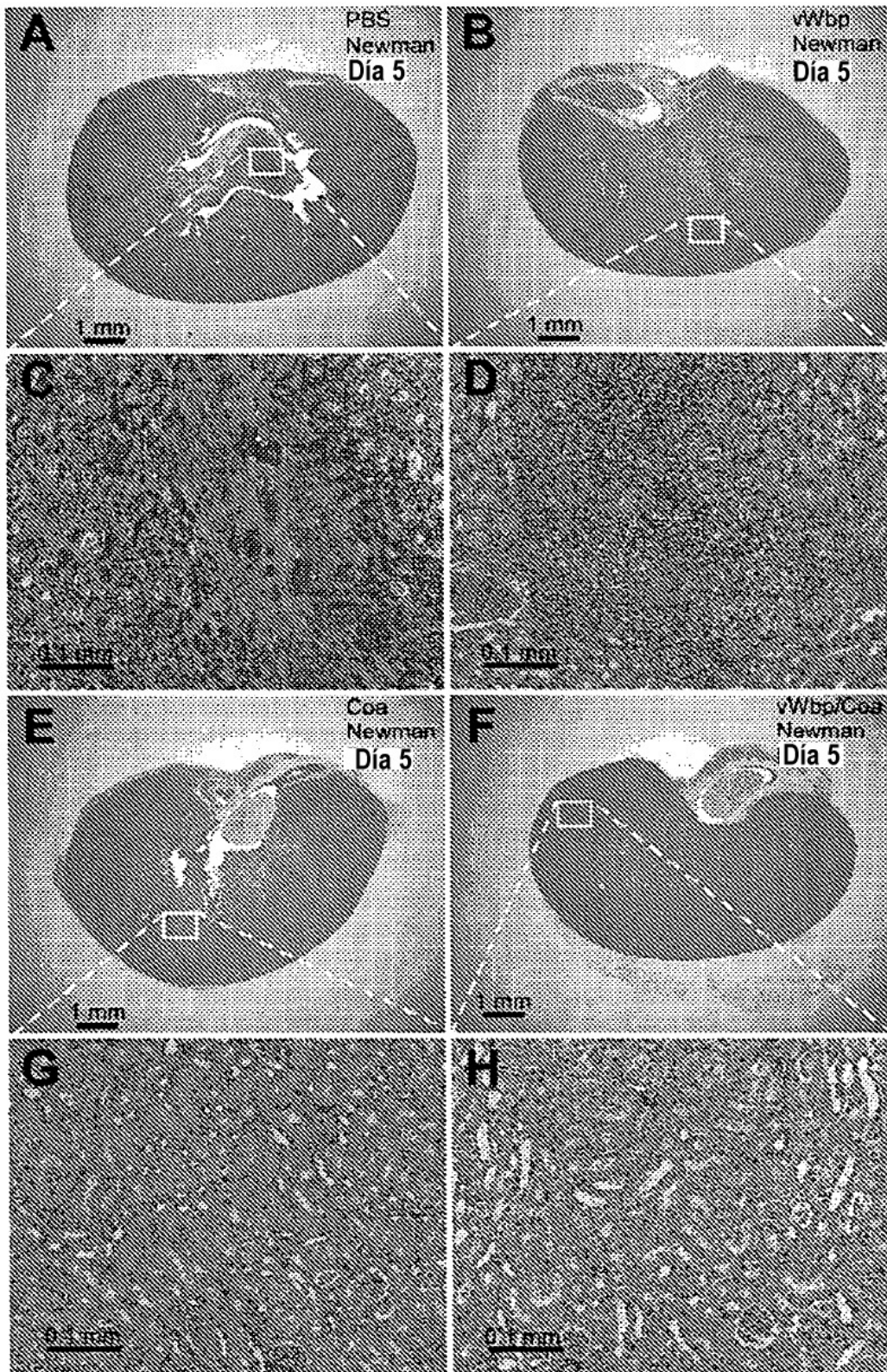


FIG. 17