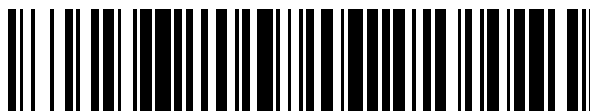


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 125**

51 Int. Cl.:

A61K 39/085 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

C07K 14/31 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2006 E 06734951 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 1853306**

54 Título: **Polipéptidos de Staphylococcus aureus y métodos de uso**

30 Prioridad:

14.02.2005 US 652843 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2016

73 Titular/es:

**EPITOPIX, LLC (100.0%)
3735 COUNTY ROAD 5
WILLMAR, MN 56201, US**

72 Inventor/es:

**EMERY, DARYLL, A.;
STRAUB, DARREN, E.;
WONDERLING, LAURA y
HERRON OLSON, LISA, L.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 586 125 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

Polipéptidos de *Staphylococcus aureus* y métodos de uso

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. n.º de serie 60/652.843, presentada el 14 de febrero de 2005.

Antecedentes

10 Las bacterias gram positivas son un grupo muy diverso de organismos que causan varias enfermedades tanto en seres humanos como en animales. Algunos de los patógenos reconocidos como importantes en la salud humana y/o animal incluyen bacterias pertenecientes a las familias de *Corynebacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Micrococcaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae* y *Peptococcaceae*, que incluyen especies bacterianas tales como *Actinomyces* sp., *Bifidobacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Erysipelothrix* sp., *Eubacterium* sp., *Kytococcus* sp.,
 15 *Lactobacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Mobiluncus* sp., *Mycobacteria* sp., *Peptostreptococcus* sp., *Propionibacterium* sp. y *Staphylococcus* sp. Estos patógenos producen una multitud de manifestaciones clínicas en muchas especies animales distintas. El tratamiento de dichas infecciones ha sido históricamente el de los antibióticos que atacan a las estructuras y funciones comunes de los organismos gram positivos. Sin embargo, muchos de los organismos gram positivos más ubicuos han desarrollado resistencia a varias clases de antibióticos, dificultando el tratamiento de las
 20 infecciones. El uso generalizado de antibióticos en el tratamiento de enfermedades bacterianas tanto en seres humanos como en animales de producción alimentaria es probablemente un importante factor que contribuye en la proliferación de cepas resistentes a los antibióticos de muchas especies de organismos gram positivos. Por lo tanto, hay una gran necesidad de encontrar diferentes tratamientos que prevengan o eliminen las infecciones por organismos gram positivos en animales, así como en seres humanos.

25 Infecciones estafilocócicas en los animales agropecuarios

En la industria agropecuaria, una serie de importantes enfermedades está causada por organismos gram positivos. Los ejemplos de afecciones clínicas causadas por infecciones bacterianas gram positivas incluyen mastitis, septicemia, neumonía, osteomielitis, meningoencefalitis, linfangitis, dermatitis, infecciones del tracto genital, metritis, enfermedad perinatal, abscesos hipofisarios, artritis, bursitis, orquitis, cistitis y pielonefritis, linfadenitis caseosa, tuberculosis, linfangitis ulcerosa, erisipela, laminitis, enfermedad de Tyzzer, tétanos, botulismo, enteritis, edema maligno, basquilla, hemoglobinuria bacilar, enterotoxemia. *Staphylococcus* sp., en particular, son capaces de infectar muchas especies diferentes de animales agrícolas, y pueden causar enormes pérdidas económicas. Por ejemplo, se
 30 estima que la industria láctea estadounidense pierde aproximadamente 185 dólares por vaca al año debido a la mastitis, una enfermedad que suele estar causada por *Staphylococcus aureus*. Dado que hay 9,5 millones de cabezas de vacas lecheras en EE.UU., el coste anual de la mastitis es de aproximadamente 1,8 mil millones de dólares. Esto es aproximadamente el 10 % del valor total de las ventas de leche de granja, y aproximadamente dos tercios de esta pérdida se debe a la reducción de la producción de leche en vacas infectadas subclínicamente. Otras
 35 pérdidas se deben a la leche anómala deseada y a la leche retenida de vacas tratadas con antibióticos, el coste de reemplazo temprano de vacas afectadas, la reducción del valor de venta de vacas de desecho, el coste de los fármacos y los servicios veterinarios, y el aumento de los costes laborales. Además de su frecuencia dentro de la industria láctea bovina, la mastitis causada por cocos gram positivos también es común entre las cabras y las ovejas. Otras enfermedades de animales adicionales causadas por *S. aureus* incluyen botriomicosis en caballos,
 40 sinovitis purulenta y osteomielitis en aves de corral, moqueo en conejos, abortos en el ganado porcino y piemia por garrapatas en corderos. Otras especies de estafilococos son los principales patógenos de la piel de origen canino (*S. intermedius*) y porcino (*S. hycius*). En las especies de aves de corral, los patógenos de estafilococos causan endocarditis y septicemia.

50 Infecciones estafilocócicas en los seres humanos

Staphylococcus sp. también son patógenos humanos causantes de una gran variedad de infecciones. La especie *Staphylococcus aureus*, un colonizador común de la mucosa y de la piel humanas, es un patógeno oportunista que puede causar diversas infecciones humanas. Por ejemplo, *S. aureus* es el agente causante de varias infecciones
 55 cutáneas, incluyendo impétigo, furunculosis, celulitis y el síndrome de la piel escaldada, así como infecciones de heridas postquirúrgicas potencialmente letales. Además, la exposición de personas inmunocomprometidas a *S. aureus* en los hospitales ha dado lugar a infecciones de órganos tales como neumonía, infecciones del tracto urinario, osteomielitis, artritis, bacteriemia y endocarditis. *S. aureus* también es el agente causante de la toxinosis, más concretamente, del síndrome de choque tóxico y la intoxicación alimentaria. La intoxicación alimentaria causada por la enterotoxina estafilocócica B es la causa más común de enfermedades transmitidas por alimentos, superando
 60 incluso a la salmonelosis, la campilobacteriosis y la listeriosis. Otras especies de estafilococos también causan enfermedad en seres humanos; *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* y *S. hominis* infectan los dispositivos médicos implantados y *S. saprophyticus* se asocia con infecciones del tracto urinario en las mujeres.

65

Mecanismos de virulencia de los estafilococos

Los estafilococos infectan varios tejidos del huésped y evaden el sistema inmune a través de la producción de varios tipos de proteínas secretadas, factores de virulencia expresados en la superficie y sistemas metabólicos diseñados para sobrevivir en medio de los recursos limitados y las defensas activas asociadas con el entorno del huésped. La colonización es la primera etapa necesaria en el establecimiento de la infección; numerosos factores, incluyendo la cápsula, el ácido lipoteicoico y el ácido teicoico son componentes estructurales comunes que contribuyen a la colonización. Además, las proteínas de la superficie, tales como la proteína de unión a la fibronectina estafilocócica y las proteínas de unión a la sialoproteína ósea se unen específicamente a los componentes del tejido del huésped. Las toxinas se suelen producir entre estafilococos patógenos, y son muy perjudiciales. Varias enfermedades humanas, incluyendo la intoxicación alimentaria, el síndrome de choque tóxico y las afecciones cutáneas exfoliativas, son el resultado directo de proteínas toxinas secretadas extracelularmente. Un único aislamiento puede codificar genes de 20-30 toxinas secretadas diferentes. Algunos de los productos proteicos secretados son superantígenos que se pueden unir de forma inespecífica a la molécula del MHC de clase II de una célula presentadora de antígeno y, simultáneamente, al receptor de linfocitos T de un linfocito T. La unión induce la señalización de los linfocitos T y conduce a la liberación de altos niveles de factores proinflamatorios, provocando, en última instancia, daño en el huésped debido a la abrumadora respuesta inmune. Otra clase de factores de virulencia expresados en la superficie disfrazan las bacterias del sistema inmune del huésped. Por ejemplo, la proteína A expresada en la superficie de *S. aureus* inhibe la opsonización y la fagocitosis mediante la unión del componente de Fc del anticuerpo del huésped. Numerosas proteasas, hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa también ayudan a las bacterias en la extracción de nutrientes de las células circundantes, protegiéndolas contra las defensas del huésped.

Resistencia a los antibióticos entre los estafilococos

El CDC estima que cada año cerca de 2 millones de personas en Estados Unidos adquieren una infección nosocomial, produciendo 90.000 muertes al año. De estas infecciones letales, el 70 % están causadas por bacterias resistentes a los antibióticos. El aumento de la resistencia a antibióticos entre las especies microbianas es particularmente destacado en la piel y en las mucosas, como las colonizadoras tales como *S. aureus*. Por ejemplo, la gran mayoría de los *S. aureus* aislados de los hospitales son resistentes a la penicilina, y el 50 % también son resistentes a las penicilinas semisintéticas tales como la meticilina, la nafcilina y la oxacilina. Estos aislados, conocidos como SARM (*S. aureus* resistente a la meticilina) fueron vistos por primera vez en la década de los 70, y se han establecido firmemente en el entorno hospitalario. Recientemente, se han producido varios casos de infecciones por SARM en la comunidad, en la que los individuos infectados no se habían expuesto previamente a los hospitales ni a los trabajadores sanitarios. Esta alarmante tendencia se intensifica por el aislamiento de aislados de SARM que son menos susceptibles a la vancomicina, un glucopéptido usado para tratar la SARM. Muy pocas cepas han mostrado ser verdaderamente resistentes a la vancomicina según la definición del CDC de resistencia a la vancomicina, pero varias cepas de SARM se han caracterizado como que consisten en subpoblaciones con susceptibilidad reducida a la vancomicina o SAIV (*S. aureus* de susceptibilidad intermedia a la vancomicina). Dado que el aislamiento de cepas resistentes a la vancomicina y de susceptibilidad intermedia a la vancomicina es un fenómeno relativamente nuevo, hay pocos datos sobre su frecuencia en los hospitales y/o la comunidad. En alguna ocasión, también se ha extraído de seres humanos SARV (*S. aureus* resistente a la vancomicina), con plena resistencia a la vancomicina y que porta un plásmido de resistencia probablemente adquirido de *Enterococcus* sp.

Estrategias para la prevención y el tratamiento de las infecciones por *Staphylococcus*

La aparición de numerosos patógenos gram positivos que son resistentes a múltiples antibióticos ha impulsado los esfuerzos de investigación dirigidos a desarrollar vacunas preventivas para proteger contra la enfermedad. Las vacunas están diseñadas para administrarse a los pacientes con el fin de generar una respuesta de memoria a largo plazo del sistema inmunológico, de manera que, si se encuentra el patógeno en el futuro, el sistema inmune lo pueda eliminar más rápida y eficazmente. Hasta la fecha, no se cuenta con una vacuna ampliamente protectora contra patógenos gram positivos asociados con una serie de enfermedades humanas graves, en particular, con las enfermedades asociadas con infecciones estafilocócicas. Las metodologías de desarrollo de vacunas para la prevención de infecciones estafilocócicas incluyen las que informan del uso de componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de la matriz de adhesión [MSCRAMMS (Nilsson *et al.* 1998. *J Clin Invest* 101:2640-9; Menzies *et al.* 2002. *J Infect Dis* 185:937-43; Fattom *et al.* 2004. *Vaccine* 22:880-7)], polisacáridos de la superficie (McKenney *et al.* 2000; McKenney *et al.* 1999. *Science* 284:1523-7; Maira-Litran *et al.* 2002. *Infect Immun* 70:4433-40; Maira-Litran *et al.* 2004. *Vaccine* 45 22:872-9; Maira-Litran *et al.* 2005. *Infect Immun* 73:6752-62) y exoproteínas mutadas (Lowell *et al.* 1996. *Infect Immun* 64:4686-93; Stiles *et al.* 2001. *Infect Immun* 69:2031-6; Gampfer *et al.* 2002. *Vaccine* 20:3675-84), como antígenos en composiciones vacunales subunitarias, así como una cepa avirulenta viva (Reinoso *et al.* 2002. *Can J Vet Res* 66:285-8) y varias metodologías de vacunas de ADN (Ohwada *et al.* 1999. *J Antimicrob Chemother* 44:767-74); Brouillette *et al.* 2002. *Vaccine* 20:2348-57; Senna *et al.* 2003. *Vaccine* 21:2661-6). Aunque muchas de estas composiciones han mostrado algún grado de protección, han logrado poca protección cruzada contra diversas cepas estafilocócicas y tampoco han logrado generar respuestas inmunes sustanciales en pacientes inmunocomprometidos, una importante población de riesgo para las infecciones nosocomiales.

Las enfermedades estafilocócicas más graves son las mediadas por las exotoxinas pirógenas superantigénicas mencionadas anteriormente (SPE) que estimulan de forma inespecífica los linfocitos T independientes de la presentación de antígenos. Dichas enfermedades incluyen el síndrome de choque tóxico, la enfermedad cutánea exfoliativa y, posiblemente, el síndrome de Kawasaki. Para estas enfermedades mediadas por SPE, los agentes inmunoterapéuticos que estimulan el sistema inmune durante una infección activa suelen ser más eficaces que las vacunas, que normalmente se administran antes de la infección. La naturaleza abrumadora de la respuesta inmune a las SPE requiere una rápida reducción de la actividad de la toxina como el primer objetivo de la terapia. Hasta la fecha, la neutralización de toxinas en la enfermedad mediada por *S. aureus* se ha llevado a cabo más eficazmente mediante la administración de inmunoglobulina humana intravenosa (IVIG), un preparado de anticuerpo humano concentrado, purificado, de varios miles de donantes humanos (Takei *et al.* 1993. *J Clin Invest* 91:602-7; Stohl y Elliot. 1996. *Clin Immunol Immunopathol* 79:122-33). La amplia distribución de *S. aureus*, que coloniza aproximadamente el 30 % de los adultos humanos sanos, coincide con las altas tasas de exposición para la mayoría de la población, por lo que el nivel de anticuerpos anti-toxina anti-estafilocócicos de IVIG suele bastar para neutralizar la toxina el tiempo suficiente para estabilizar la respuesta inmune hasta que la carga bacteriana se reduce con antibióticos (Schlievert, 2001. *J Allergy Clin Immunol* 108(4 Supl):S107-110). Los preparados de IVIG de múltiples fabricantes han demostrado neutralizar la toxina en ensayos de proliferación con células mononucleares de sangre periférica humanas, inhibir la diferenciación de los linfocitos B impulsada por linfocitos T humanos inducidos por la toxina *in vitro* (Stohl y Elliot. 1996. *Clin Immunol Immunopathol* 79:122-33; Stohl y Elliott. 1995. *J Immunol* 155:1838-50; Stohl *et al.* 1994. *J Immunol* 153:117-27) y reducir la secreción de IL-4 y IL-2 en PBMC estimuladas con enterotoxina estafilocócica B (Takei *et al.* 1993. *J Clin Invest* 91:602-7; Darenberg *et al.* 2004. *Clin Infect Dis* 38:836-42). La terapia con IVIG, con su capacidad demostrada para neutralizar la SPE, es ahora una terapia recomendada para el síndrome de Kawasaki y está ganando terreno como método de tratamiento para el síndrome del choque tóxico estafilocócico (Schlievert 2001. *J Allergy Clin Immunol* 108(4 Supl):S107-110). También se ha investigado el uso de IVIG como lavado de heridas inmunoprotector durante la cirugía en ratones (Poelstra *et al.* 2000. *Tissue Eng* 6(4):401-411). Aunque la IVIG convencional tiene utilidad para limitar el avance de alguna enfermedad mediada por SPE estafilocócica, la seguridad, la eficacia y la consistencia de los preparados de IVIG humanos generados a partir de miles de donantes humanos no seleccionados sigue siendo controvertida (Baker *et al.* 1992. *N Engl J Med* 327:213-9; Miller *et al.* 2001. *J Allergy Clin Immunol* 108:S91-4; Sacher, 2001. *J Allergy Clin Immunol* 108:S139-46; Darenberg *et al.* 2004. *Clin Infect Dis* 38:836-42). Además, el beneficio de IVIG en la prevención de algunas infecciones estafilocócicas es dudoso (Baker *et al.* 1992. *N Engl J Med* 327:213-9; Hill, H. R. 2000. *J Pediatr* 13147:595-7; Darenberg *et al.* 2004. *Clin Infect Dis* 38:836-42). Con el fin de aumentar la eficacia de IVIG en el tratamiento de las infecciones estafilocócicas en ciertas poblaciones de riesgo, se creó una IgG humana anti-estafilocócica policlonal, seleccionada de donantes, derivada de plasma, con altos títulos de anticuerpo dirigido hacia el factor de aglutinación A de MSCRAMMS estafilocócico (ClfA) y la proteína de unión a fibrinógeno G (SdrG), y se ensayó con éxito en recién nacidos de muy bajo peso al nacer para prevenir la sepsis estafilocócica (Vernachio *et al.* 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3400-6; Bloom *et al.* 2005. *Pediatr Infect Dis J* 24:858-866; Capparelli *et al.* 2005. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4121-7). También se está desarrollando un anticuerpo monoclonal humanizado específico hacia el factor de aglutinación A de MSCRAMMS de *S. aureus*. Se seleccionó el anticuerpo de un grupo de miles de anticuerpos anti-ClfA murinos por su capacidad para unirse a ClfA de una manera que inhibe la unión de *S. aureus* a la fibronectina humana, y posteriormente se humanizó mediante la mutación de restos específicos dirigidos para imitar el anticuerpo del subgrupo de la línea germinal humana homóloga (Hall *et al.* 2003. *Infect Immun* 71:6864-70; Domanski *et al.* 2005. *Infect Immun* 73:5229-32). El anticuerpo específico se está diseñando para su uso en combinación con antibióticos para el tratamiento de la infección por *S. aureus* grave potencialmente mortal, aunque los estudios en animales también demostraron un efecto protector profiláctico.

Sumario

La presente invención proporciona una composición obtenida mediante un proceso que comprende proporcionar un cultivo que comprende un *Staphylococcus aureus*, en el que el *Staphylococcus aureus* se ha adaptado al crecimiento en condiciones de bajo nivel de hierro mediante el subcultivo del *Staphylococcus aureus* en medio que contiene concentraciones crecientes de 2,2'-dipiridilo de 300 μM a 1.600 μM , y en el que el *Staphylococcus aureus* se cultiva en presencia de 2,2'-dipiridilo 1.600 μM ; alterar el *Staphylococcus aureus* para producir una mezcla de células de *Staphylococcus aureus* rotas; disolver la mezcla para producir un preparado que contiene proteínas disueltas y no disueltas; y aislar las proteínas no disueltas, en el que el *Staphylococcus aureus* es la cepa ATCC 19636 de *S. aureus*. También se desvelan composiciones que incluyen dos o más polipéptidos aislados. Los dos polipéptidos aislados pueden tener un peso molecular de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa, 33 kDa, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, una composición puede incluir proteínas aisladas de 88 kDa y 55 kDa. En algunos aspectos, la composición puede incluir polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa y 33 kDa. El peso molecular se determina por electroforesis en un gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida. Los polipéptidos se pueden aislar a partir de un *Staphylococcus aureus* cuando se incuban en medios que incluyen un quelante del hierro, y no se pueden aislar cuando se cultivan en los medios sin el quelante del hierro. La composición protege a un animal, tal como un ratón o una vaca, o a un ser humano contra el desafío con una cepa de *S. aureus*, por ejemplo, la cepa ATCC 19636. La composición puede incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable, y puede incluir además un polipéptido aislado que tenga un peso molecular de 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa, 40 kDa, o una

combinación de los mismos, y que se puede aislar de un *S. aureus* cuando se cultiva en el medio sin el quelante del hierro. En algunos aspectos, los polipéptidos de la composición se pueden aislar de la cepa ATCC 19636 de *S. aureus*.

5 La presente invención también proporciona usos de las composiciones de la invención. En un aspecto, el uso es para el tratamiento de una infección en un sujeto, e incluye el uso de una cantidad eficaz de una composición de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección en un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una infección causada por un *Staphylococcus aureus*. En otro aspecto, el uso es para el tratamiento de un síntoma en un sujeto, y este incluye el uso de una cantidad eficaz de una composición de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar un síntoma en un sujeto que tiene una infección causada por un *Staphylococcus aureus*. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano, un caballo o una vaca.

15 La presente divulgación proporciona además métodos de uso de anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo policlonal, que se une específicamente a polipéptidos desvelados en el presente documento. En un aspecto, el método es para tratar una infección en un sujeto, e incluye la administración de una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una infección causada por un *Staphylococcus* sp., en el que la composición incluye el anticuerpo que se une específicamente a dos polipéptidos aislados de la presente divulgación. En otro aspecto, el método es para tratar un síntoma en un sujeto, e incluye la administración de una cantidad eficaz de una composición a un sujeto que tiene una infección causada por un *Staphylococcus* sp., en el que la composición incluye el anticuerpo que se une específicamente a dos polipéptidos aislados de la presente divulgación. El sujeto puede ser un mamífero tal como un ser humano, un caballo o una vaca. El *Staphylococcus* sp. puede ser *S. aureus*.

25 La presente invención también proporciona usos para reducir la colonización en un sujeto. En un aspecto, el uso incluye el uso de una cantidad eficaz de una composición de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección en un sujeto que tiene o que está en riesgo de tener una infección causada por un *Staphylococcus aureus*, en el que se reduce la colonización en un sujeto colonizado, en el que la composición incluye el anticuerpo que se une específicamente a polipéptidos aislados de la presente divulgación.

30 La presente divulgación proporciona un kit para la detección del anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido. El kit incluye, en recipientes separados, un polipéptido aislado de la presente divulgación, y un reactivo que detecta un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido.

35 La presente divulgación proporciona además una composición que incluye dos polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares seleccionados de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa y 33 kDa, en la que el peso molecular se determina por electroforesis en un gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida. Cada polipéptido de la composición tiene un identificador genético de masa de al menos un 80 % de similitud con un identificador genético de masa de un polipéptido del mismo peso molecular expresado por la cepa ATCC 19636 de *Staphylococcus aureus*, en la que el polipéptido se puede aislar de un *Staphylococcus aureus* cuando se incuba en medio que comprende un quelante del hierro y no se puede aislar cuando se cultiva en medios sin el quelante del hierro. Por ejemplo, el polipéptido aislado con un peso molecular de 88 kDa tiene un identificador genético de masa de al menos el 80 % de similitud con un identificador genético de masa de un polipéptido de 88 kDa expresado por la cepa ATCC 19636 de *Staphylococcus aureus*, y el polipéptido aislado con un peso molecular de 55 kDa tiene una huella dactilar de masa de al menos un 80 % de similitud con un identificador genético de masa de un polipéptido de 55 kDa expresado por la cepa ATCC 19636 de *Staphylococcus aureus*.

Breve descripción de las figuras

50 Figura 1. Perfil electroforético de las proteínas de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* derivadas de diferentes especies cultivadas con y sin hierro (carriles marcados con Fe++ y DP, respectivamente).

Figura 2. Diferencia en la mortalidad entre los ratones vacunados y los no vacunados tras el desafío homólogo y heterólogo con *Staphylococcus aureus*.

55 Figura 3. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra el porcentaje de supervivencia tras la vacunación y el desafío homólogo con la cepa ATCC 19636 de *S. aureus*.

Figura 4. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra el porcentaje de supervivencia tras la vacunación y el desafío heterólogo con la cepa ATCC 19636 de *S. aureus*.

60 Figura 5. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra el porcentaje de supervivencia tras la inmunización pasiva y el desafío homólogo con la cepa ATCC 19636 de *S. aureus*.

65 Figura 6. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra el porcentaje de supervivencia tras la inmunización pasiva y el desafío heterólogo con la cepa 1477 de *S. aureus*.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

La presente invención proporciona composiciones según lo definido en las reivindicaciones. Como se usa en el presente documento, "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Así pues, por ejemplo, los términos péptido, oligopéptido, proteína, y enzima se incluyen dentro de la definición de polipéptido. Este término también incluye modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, tales como glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. El término polipéptido no connota una longitud específica de un polímero de aminoácidos. Un polipéptido se puede aislar directamente de una fuente natural, o se puede preparar con ayuda de técnicas químicas, enzimáticas o recombinantes. En el caso de un polipéptido natural, dicho polipéptido normalmente es aislado. Un polipéptido "aislado" es aquel que ha sido retirado de su entorno natural. Por ejemplo, un polipéptido aislado es un polipéptido que ha sido retirado del citoplasma o de la membrana de una célula, y muchos de los polipéptidos, ácidos nucleicos y otras materias celulares de su entorno natural ya no están presentes. Un polipéptido "aislable" es un polipéptido que se ha podido aislar de una determinada fuente. Un polipéptido "purificado" es aquel que está al menos un 60 % exento, preferentemente al menos un 75 % exento, y lo más preferentemente al menos un 90 % exento de otros componentes con los que se asocia de manera natural. Los polipéptidos que se producen fuera del organismo en el que se dan de manera natural, por ejemplo, por medios recombinantes o químicos, se consideran aislados y purificados por definición, ya que nunca estuvieron presentes en un entorno natural. Como se usa en el presente documento, un "fragmento de polipéptido" se refiere a una porción de un polipéptido que resulta de la digestión de un polipéptido con una proteasa. A menos que se especifique de otro modo, "un", "una", "el", "la" y "al menos un/a" se usan indistintamente, y significan uno o más de uno. El término "comprende" y sus variantes no tienen un significado límite en que estos términos aparecen en la descripción y reivindicaciones.

Un polipéptido de la presente divulgación puede caracterizarse por el peso molecular, el identificador genético de masa o una combinación de los mismos. El peso molecular de un polipéptido, normalmente expresado en kilodalton (kDa), se puede determinar usando métodos de rutina, incluyendo, por ejemplo, filtración en gel, electroforesis en gel que incluye la electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio (SDS) y poliacrilamida (PAGE), electroforesis capilar, espectrometría de masas y cromatografía de líquidos, incluyendo HPLC. Preferentemente, el peso molecular se determina mediante la resolución de un polipéptido usando un gel de SDS-poliacrilamida que tiene un gel de apilamiento del aproximadamente 4 % y un gel de resolución del aproximadamente 10 % en condiciones reductoras y desnaturalizantes. A menos que se indique lo contrario, el peso molecular se refiere al peso molecular determinado por SDS-PAGE. Como se usa en el presente documento, un "identificador genético de masa" se refiere a una población de fragmentos polipeptídicos obtenidos a partir de un polipéptido tras la digestión con una proteasa. Por lo general, los fragmentos polipeptídicos resultantes de una digestión se analizan usando un método de espectrometría de masas. Cada fragmento polipeptídico se caracteriza por una masa, o por una proporción de la masa (m) con respecto a la carga (z), que se conoce como "proporción de m/z" o "valor de m/z". Los métodos de generación de un identificador genético de masa de un polipéptido son habituales. En el Ejemplo 13, se desvela un ejemplo de dicho método.

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden ser polipéptidos regulados por el nivel de metal. Como se usa en el presente documento, un "polipéptido regulado por el nivel de metal" es un polipéptido que es expresado por un microbio a un nivel superior cuando el microbio se cultiva en condiciones de bajo nivel de metal en comparación con el crecimiento del mismo microbio en condiciones de alto nivel de metal. Las condiciones de bajo y de alto nivel de metal se describen en el presente documento. Por ejemplo, una clase de polipéptido regulado por el nivel de metal producido por *Staphylococcus* sp. no se expresa a niveles detectables durante el crecimiento del microbio en condiciones de alto nivel de metal, pero sí se expresa a niveles detectables durante el crecimiento en condiciones de bajo nivel de metal. Los ejemplos de dichos polipéptidos regulados por el nivel de metal que se pueden aislar de *S. aureus* tras su crecimiento en condiciones de bajo nivel de hierro tienen pesos moleculares de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa y 33 kDa. Los ejemplos de dichos polipéptidos regulados por el nivel de metal que se pueden aislar de *S. aureus* tras el crecimiento en condiciones de bajo nivel de cinc y de bajo nivel de cobre tienen pesos moleculares de 115 kDa, 88 kDa, 80 kDa, 71 kDa, 69 kDa, 35 kDa, 30 kDa, 29, kDa y 27 kDa.

La presente divulgación también incluye polipéptidos que no están regulados por el nivel de metal. Dichos polipéptidos se expresan en presencia de un ion metálico, tal como cloruro férrico, y también se expresan cuando se cultivan en condiciones de bajo nivel de hierro. Los ejemplos de dichos polipéptidos que se pueden aislar de *S. aureus* tienen pesos moleculares de 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa y 40 kDa.

Es posible determinar si un polipéptido es un polipéptido regulado por el nivel de metal o no mediante métodos útiles para la comparación de la presencia de polipéptidos, incluyendo, por ejemplo, filtración en gel, electroforesis en gel, incluyendo la electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE), electroforesis capilar, espectrometría de masas y cromatografía de líquidos que incluye la HPLC. Se cultivan los cultivos separados de un microbio en condiciones de alto nivel de metal y en condiciones de bajo nivel de metal, se aíslan polipéptidos de la presente invención como se describe en el presente documento, y los polipéptidos presentes en cada cultivo se resuelven y se comparan. Por lo general, se usa una cantidad igual de polipéptidos de cada cultivo. Preferentemente, los polipéptidos se resuelven usando un gel de SDS-poliacrilamida que tiene un gel de apilamiento

del aproximadamente 4 % y un gel de resolución del aproximadamente 10 % en condiciones reductoras y desnaturalizantes. Por ejemplo, se pueden usar 30 microgramos (µg) de polipéptido total de cada cultivo y cargarse en pocillos de un gel. Tras procesar el gel y teñir los polipéptidos con azul de Coomassie Brilliant, se pueden comparar los dos carriles. Al determinar si un polipéptido se expresa o no a un nivel detectable, se resuelven 30 µg de polipéptido total de un cultivo en un gel de SDS-PAGE y se tiñen con azul de Coomassie Brilliant usando métodos conocidos en la técnica. Se considera que, cuando un polipéptido se puede visualizar a simple vista, se expresa a un nivel detectable, mientras que un polipéptido que no se puede visualizar a simple vista no se expresa a un nivel detectable.

Los polipéptidos de la presente divulgación pueden tener actividad inmunogénica. "Actividad inmunogénica" se refiere a la capacidad de un polipéptido para generar una respuesta inmunológica en un animal. Una respuesta inmunológica hacia un polipéptido es el desarrollo, en un animal, de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos hacia el polipéptido. Por lo general, una respuesta inmunológica incluye, pero sin limitación, uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, linfocitos B, linfocitos T auxiliares, linfocitos T supresores, y/o linfocitos T citotóxicos, dirigidos a un epítipo o epítopos del polipéptido. "Epítipo" se refiere al sitio en un antígeno al que los linfocitos B y/o linfocitos T específicos responden de modo que se produce el anticuerpo. La actividad inmunogénica puede ser protectora. "Actividad inmunogénica protectora" se refiere a la capacidad de un polipéptido para generar una respuesta inmunológica en un animal que prevenga o inhiba la infección por *Staphylococcus* sp., por ejemplo, *S. aureus*. Se puede determinar si un polipéptido tiene actividad inmunogénica protectora mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos 5, 9 o 12. Por ejemplo, un polipéptido de la presente divulgación, o una combinación de polipéptidos de la presente divulgación, protege un roedor tal como un ratón contra el desafío a un *Staphylococcus* sp. Un polipéptido de la presente divulgación puede tener actividad seroactiva. "Actividad seroactiva" se refiere a la capacidad de un polipéptido candidato para reaccionar con anticuerpos presentes en el suero de convaleciente de un animal infectado con un *Staphylococcus* sp., por ejemplo, *S. aureus*. En algunos aspectos, el suero de convaleciente puede ser de un animal infectado con el aislado de ATCC 19636, la cepa SAAV1, la cepa 2176 o la cepa 1477. Los polipéptidos de la presente divulgación pueden tener actividad inmunorreguladora. "Actividad inmunorreguladora" se refiere a la capacidad de un polipéptido para actuar de una manera inespecífica para mejorar una respuesta inmune hacia un determinado antígeno. Los métodos de determinación de si un polipéptido tiene actividad inmunorreguladora son conocidos en la técnica.

Un polipéptido de la presente divulgación puede tener las características de un polipéptido expresado por un microbio de referencia. Las características pueden incluir tanto el peso molecular como el identificador genético de masa. El microbio de referencia puede ser un gram positivo, preferentemente un miembro de la familia *Micrococcaceae*, preferentemente, *Staphylococcus* sp., más preferentemente, *Staphylococcus aureus*. Los ejemplos preferidos de cepa se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas

Célula bacteriana	Designación de laboratorio
<i>S. aureus</i>	Aislado ATCC 19636
<i>S. aureus</i>	cepa SAAV1
<i>S. aureus</i>	cepa 1477
<i>S. aureus</i>	cepa 2176

Cuando el microbio de referencia es el aislado ATCC 19636 de *S. aureus*, un polipéptido candidato se considera que es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa o 33 kDa, y tiene un identificador genético de masa que es similar al identificador genético de masa de un polipéptido regulado por el nivel de metal expresado por un microbio de referencia y que tiene un peso molecular de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa o 33 kDa, respectivamente. Preferentemente, dichos polipéptidos son regulados por el nivel de metal. Por ejemplo, un polipéptido candidato es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular de 88 kDa y tiene un identificador genético de masa similar al identificador genético de masa de un polipéptido regulado por el nivel de metal de 88 kDa producido por la cepa de referencia de aislado ATCC 19636 de *S. aureus*.

Cuando el microbio de referencia es el aislado ATCC SAAV1 de *S. aureus*, un polipéptido candidato se considera que es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular (determinado por SDS-PAGE) de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa o 33 kDa, y tiene un identificador genético de masa que es similar al identificador genético de masa de un polipéptido expresado por un microbio de referencia y que tiene un peso molecular (determinado por SDS-PAGE) de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa o 33 kDa, respectivamente. Preferentemente, dichos polipéptidos están regulados por el nivel de metal. Por ejemplo, un polipéptido candidato es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular de 88 kDa y tiene un identificador genético de masa similar al identificador genético de masa de un polipéptido regulado por el nivel de

metal de 88 kDa producido por la cepa de referencia de aislado SAAV1 de *S. aureus*.

5 Cuando el microbio de referencia es la cepa 2176 de *S. aureus*, un polipéptido candidato se considera que es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular (determinado por SDS-PAGE) de 88 kDa, 80 kDa, 65 kDa, 55 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa, 33 kDa o 32 kDa, y tiene un identificador genético de masa que es similar al identificador genético de masa de un polipéptido expresado por un microbio de referencia y que tiene un peso molecular (determinado por SDS-PAGE) de 88 kDa, 80 kDa, 65 kDa, 55 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa, 33 kDa o 32 kDa, respectivamente. Preferentemente, dichos polipéptidos son regulados por el nivel de metal. Por ejemplo, un polipéptido candidato es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular de 88 kDa y tiene un
10 identificador genético de masa similar al identificador genético de masa de un polipéptido regulado por el nivel de metal de 88 kDa producido por la cepa de referencia de aislado 2176 de *S. aureus*.

15 Cuando el microbio de referencia es la cepa 1477 de *S. aureus*, un polipéptido candidato se considera que es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular (determinado por SDS-PAGE) de 88 kDa, 80 kDa, 65 kDa, 55 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa, 33 kDa o 32 kDa, y tiene un identificador genético de masa que es similar al identificador genético de masa de un polipéptido expresado por un microbio de referencia y que tiene un peso molecular (determinado por SDS-PAGE) de 88 kDa, 80 kDa, 65 kDa, 55 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa, 33 kDa o 32 kDa, respectivamente. Preferentemente, dichos polipéptidos son regulados por el nivel de metal. Por ejemplo, un polipéptido candidato es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular de 88 kDa y tiene un
20 identificador genético de masa similar al identificador genético de masa de un polipéptido regulado por el nivel de metal de 88 kDa producido por la cepa de referencia de aislado 1477 de *S. aureus*.

25 Los polipéptidos expresados por un microbio de referencia y mencionados anteriormente en peso molecular se pueden obtener mediante el crecimiento del microbio de referencia en condiciones de bajo nivel de metal y el posterior aislamiento de un polipéptido mediante los procesos desvelados en el presente documento. Un polipéptido candidato es aislable de un microbio, preferentemente un microbio gram positivo, más preferentemente, un miembro de la familia *Micrococcaceae*, preferentemente, *Staphylococcus* sp., más preferentemente, *Staphylococcus aureus*.

30 Otros microbios gram positivos a partir de los que se pueden aislar polipéptidos incluyen *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Erysipelothrix* sp., *Kytococcus* sp. y *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp. y *Erysipelothrix* sp. Un polipéptido candidato también se puede producir usando técnicas recombinantes, enzimáticas o químicas.

35 Un polipéptido candidato se puede evaluar mediante el análisis de espectrometría de masas para determinar si el polipéptido candidato tiene un identificador genético de masa similar a uno de los polipéptidos expresados por un microbio de referencia y mencionado anteriormente en peso molecular. Por lo general, el polipéptido candidato se aísla, por ejemplo, mediante la resolución del polipéptido candidato por electroforesis en gel y la escisión de la parte del gel que contiene el polipéptido candidato. Se puede usar cualquier método de electroforesis en gel que separa los polipéptidos basándose en diferentes características, incluyendo la electroforesis en gel monodimensional o bidimensional, así como la separación cromatográfica de líquidos basada en, por ejemplo, en la hidrofobicidad, pl o tamaño. El polipéptido candidato se fragmenta, por ejemplo, mediante la digestión con una proteasa. Preferentemente, la proteasa escinde el enlace peptídico en el lado carboxi-terminal del aminoácido lisina y el aminoácido arginina, excepto cuando el aminoácido que sigue a la lisina o a la arginina es una prolina. Un ejemplo de dicha proteasa es la tripsina. Los métodos para la digestión de un polipéptido con tripsina son habituales y conocidos en la técnica. En el Ejemplo 13, se desvela un ejemplo de dicho método.
45

50 Los métodos de análisis de espectrometría de masas de polipéptidos son habituales y conocidos en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS). Por lo general, se mezcla una mezcla que contiene los fragmentos polipeptídicos obtenidos a partir de un polipéptido candidato con una matriz que funciona para transformar la energía del láser en la muestra y producir fragmentos polipeptídicos ionizados, preferentemente monoisotópicos. Los ejemplos de matrices que se pueden usar incluyen, por ejemplo, ácido sinapínico o ácido ciano-4-hidroxicinámico. En el Ejemplo 13, se describe un ejemplo de un método para el análisis de polipéptidos mediante MALDI-TOF MS. Los fragmentos polipeptídicos ionizados se separan de acuerdo con su proporción de m/z, y se detectan para producir un espectro de la proporción de m/z frente a la intensidad. El espectro incluye valores de m/z que representan los fragmentos polipeptídicos derivados del polipéptido candidato. Para cualquier polipéptido dado, la cantidad de cada fragmento polipeptídico resultante de una digestión con tripsina debe ser equimolar. Sin embargo, se sabe que la digestión con tripsina no es siempre un 100 % eficaz, por ejemplo, algunos sitios se escinden de manera más eficaz. Por lo tanto, cuando se usa MALDI-TOF MS para determinar los valores de m/z, la intensidad de cada valor de m/z normalmente no es idéntica. En general, un espectro tiene un nivel de fondo de ruido presente en la mayor parte del eje X (es decir, el eje que tiene los valores de las proporciones de m/z). Este nivel de fondo de ruido varía dependiendo de las condiciones de procesamiento y de la máquina usada, y se identifica fácilmente examinando visualmente el espectro. En general, se considera que un valor de m/z representa un fragmento polipeptídico cuando la intensidad es al menos 2 veces superior, al menos 3 veces superior o al menos 4 veces superior al nivel de fondo de ruido. El espectro normalmente incluye otros valores de m/z que son aberraciones producidas como resultado, por ejemplo, de una digestión incompleta, una digestión excesiva, otros polipéptidos que pueden estar presentes en la mezcla o la proteasa usada para digerir el polipéptido que incluye los
65

valores de m/z resultantes de la autólisis de la proteasa. En la técnica, se reconoce que dicho método de digestión de un polipéptido con una proteasa da lugar a un identificador genético de masa de gran especificidad que se puede usar para caracterizar con precisión el polipéptido y distinguirlo de otros polipéptidos.

5 En este aspecto de la divulgación, cuando se analiza un polipéptido candidato mediante espectroscopia de masas, preferentemente tanto el polipéptido candidato como el polipéptido del microbio de referencia se preparan y se analizan juntos, reduciendo de esta manera las posibles aberraciones resultantes de diferencias en las condiciones de tratamiento y de procesamiento de las muestras. Preferentemente, todos los reactivos usados para preparar y analizar los dos polipéptidos son los mismos. Por ejemplo, el polipéptido del microbio de referencia y el polipéptido candidato se aíslan esencialmente en las mismas condiciones, se fragmentan esencialmente en las mismas condiciones y se analizan mediante MALDI-TOF MS en la misma máquina, esencialmente en las mismas condiciones. Un identificador genético de masa de un polipéptido candidato se considera que es similar al identificador genético de masa de un polipéptido de un microbio de referencia cuando al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o esencialmente la totalidad de los valores de m/z presentes en el espectro del polipéptido de microbio de referencia y por encima del nivel de fondo de ruido también están presentes en el espectro del polipéptido candidato.

En otro aspecto, un polipéptido se considera que es un polipéptido de la presente divulgación si tiene un peso molecular de un polipéptido de referencia descrito en la Tabla 2, 3, 4 o 5 y tiene un identificador genético de masa que incluye la población de fragmentos polipeptídicos del polipéptido de referencia que se enumeran en la Tabla 2, 3, 4 o 5. Por ejemplo, un polipéptido de la presente divulgación incluye un polipéptido de 88 kDa y un identificador genético de masa que incluye fragmentos polipeptídicos que tienen masas de HVDVR, YSYER, IIGDYRR, IFTDYRK, ELKELGQK, YAQVKPIR, QMQFFGAR, SMQPFGGIR, VSGYAVNFIK, NHATAWQGFK, LWEQVMQLSK, SLGKEPEDQNR, DGISNTFSIVPK, AGVITGLPDAYGR, TSTFLDIYAER, SMQPFGGIRMAK, THNQGVFDAYS, KAGVITGLPDAYGR, TLLYAINGGKDEK, IEMALHDTEIVR, AGEFPFAGANPMHGR, VALYGVDFLMEEK, KTHNQGVFDAYS, YGFDLSRPAENFK, TSSIQYENDDIMR, KAGEFPFAGANPMHGR, RVALYGVDFLMEEK, LWEQVMQLSKEER, MLETNKNHATAWQGFK, MHDFTMSTEMSEDVIR, YGNDDRVDDIAVDLVER, ETLIDAMEHPPEYPQLTIR, YAQVKPIRNEEGLVDFEIEGDFPK. El identificador genético de masa de un polipéptido candidato puede determinarse mediante un método de espectrometría de masas, por ejemplo, mediante MALDI-TOF MS. El identificador genético de masa de un polipéptido candidato, en general, tendrá fragmentos polipeptídicos adicionales y, por lo tanto, valores de m/z adicionales distintos de los enumerados para un polipéptido en la Tabla 2, 3, 4 o 5. Preferentemente, cuando el polipéptido candidato se compara con un polipéptido de la Tabla 2, 3, 4 o 5, el polipéptido candidato es aislable de un microbio, preferentemente un microbio gram positivo, más preferentemente, un miembro de la familia *Micrococcaceae*, preferentemente, *Staphylococcus* sp., más preferentemente, *Staphylococcus aureus*. Otros microbios gram positivos incluyen *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Erysipelothrix* sp., *Kytococcus* sp., *Listeria* sp., *Micrococcus* sp. y *Mycobacterium* sp. y *Erysipelothrix* sp. Un polipéptido candidato se puede obtener mediante el crecimiento de un microbio en condiciones de bajo nivel de metal y el posterior aislamiento de un polipéptido mediante los procesos descritos en el presente documento.

Es bien conocido en la técnica que se pueden introducir accidentalmente modificaciones de aminoácidos durante el tratamiento de las muestras, tal como la oxidación y la formación de derivados de carbamidometilo. Además, estos tipos de modificaciones alteran el valor de m/z de un fragmento polipeptídico. Por ejemplo, si un fragmento polipeptídico contiene una metionina que se oxida, el valor de m/z se aumentará en 16 con respecto al mismo fragmento que no contiene la metionina oxidada. Por consiguiente, estos fragmentos polipeptídicos de las Tablas 2, 3, 4 o 5 que tienen la anotación "oxidación (M)" tienen un valor de m/z aumentado en 16 con respecto al mismo fragmento que no contiene la metionina oxidada. Se entiende que los fragmentos polipeptídicos de la Tabla 2, 3, 4 o 5 se pueden modificar durante el tratamiento de las muestras.

50 Tabla 2. Características de los polipéptidos obtenidos de aislado ATCC 19636 de *S. aureus*

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
P23	88	625,4	HVDVR
		717,3	YSYER
		892,5	IIGDYRR
		942,5	IFTDYRK
		944,5	ELKELGQK
		974,6	YAQVKPIR

ES 2 586 125 T3

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		984,5	QMQFFGAR
		992,5	SMQPFGGIR
		1097,6	VSGYAVNFIK
		1159,5	NHATAWQGFK
		1261,7	LWEQVMQLSK
		1272,7	SLGKEPEDQNR
		1277,7	DGISNTFSIVPK
		1289,7	AGVITGLPDAYGR
		1315,7	TSTFLDIYAER
		1322,7	SMQPFGGIRMAK
		1394,7	THNQGVFDAYS
		1417,8	KAGVITGLPDAYGR
		1421,8	TLLYAINGGKDEK
		1426,8	IEMALHDTEIVR
		1508,8	AGEPFAPGANPMHGR
		1513,9	VALYGVDFLMEEK
		1522,8	KTHNQGVFDAYS
		1543,9	YGFDLSPAEENFK
		1571,8	TSSIQYENDDIMR
		1636,9	KAGEPFAPGANPMHGR
		1670,0	RVALYGVDFLMEEK
		1676,0	LWEQVMQLSKEER
		1876,2	MLETNKNHATAWQGFK
		2043,1	MHDFNTMSTEMSEVIR
		2078,2	YGNNDDRVDDIAVDLVER
		2285,5	ETLIDAMEHPPEYQLTIR
		2892,9	YAQVKPIRNEEGLVVDIFEIGDFPK
P25	55	783,6	LHSWLK
		911,7	KLHSWLK
		937,6	TYTFHLR
		996,6	KFDGTGPFK
		1025,6	QAIGHMVNR
		1063,6	KWDVSEDGK
		1185,6	IYNSIDDAFK
		1277,6	NLEMAMYDYK
		1324,7	ENKQLTYTTVK

ES 2 586 125 T3

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		1346,7	AESLLDEAGWKK
		1381,8	TVRQAIGHMVNR
		1394,8	TYTFHLRDDVK
	1400,7	1400,7	KGETNFAFTDDR
		1419,7	FHDGTPFDADAVK
		1422,8	NVDINFDMPTR
		1428,8	DKIYNSIDDAFK
		1483,8	EQAEYLQAEFKK
		1509,8	VMPAGETAFLSMKK
		1547,9	FHDGTPFDADAVKK
		1550,9	NVDINFDMPTRK
		1559,9	LNINGETSDKIAER
		1788,1	EILDGQEKPATQLFAK
		1930,1	GSSSQKEQAEYLQAEFK
		1946,0	DESADFNKNDQYWGEK
		2100,4	IAKEILDGQEKPATQLFAK
		2239,3	VSFTQSQYELPFNEMQYK
		2493,5	EAYQPALAEAMPRPYVFSVK + Oxidación (M)
		2900,6	DIGDMNPHVYGGMSAESMIYEPLVR + 2 Oxidación (M)
		2916,6	DIGDMNPHVYGGMSAESMIYEPLVR + 3 Oxidación (M)
P26	38	993,6	IVYVGADEK
	996,7	996,7	QALNNPVLK
		1237,7	ETVKIENNYK
		1272,7	ENPDVILAMDR
		1502,0	IAATKPEVIFISGR
		1507,9	NAWLDYGALDVMK
		1523,9	ALPNFLESFKDDK
		1559,9	LWYFAAGSTTTTIK
		1716,0	FGGLVYDTLGFNAVDK
		1737,0	IVYVGADEKNLIGSMK
		1844,1	FGGLVYDTLGFNAVDKK
		1929,1	GRFGGLVYDTLGFNAVDK
		1998,2	TVMYLLVNEGELSTFGPK
		2234,4	EVNFDKIAATKPEVIFISGR

ES 2 586 125 T3

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		3143,8	VSNSNHGQNVSN EYV NKENP DVILAMDR
P27	37	699,5	FEYIK
		729,4	DAWPLK
		792,5	ASVVNFR
		852,4	VYDQLSK
		987,5	HAMGTTEIK
		1008,5	LIDDLYEK
		1020,5	YKDAWPLK
		1074,5	EKEAEDLLK
		1083,6	LKPD LIVASK
		1169,5	FEYIKNDLK
		1182,5	KTESEWTSSK
		1184,5	YDDKVA AFQK
		1223,5	NEKVYDQLSK
		1278,6	IAPTVSTDTVFK
		1497,6	TESEWTSSKEWK
		1502,7	DAW PLKASVVNFR
		1558,8	QVDNGKDIIQLTSK
		1605,8	LIDDLYEKL NIEK
		1623,8	IVGQEPAPNLEEISK
		1712,8	ESIPLMNADHIFVVK
		1800,9	IYAGGYAGEILNDLGFK
		1957,0	IYAGGYAGEILNDLGFKR
		2252,0	NNQVSDDLDEITWNLGGYK
		3383,9	RVVTLYQGATDVA VSLG V KPVGAVESWTQKPK
P28	36	646,4	DVWAR
		725,5	IIPVR
		1068,4	IGDYTSVGTR
		1185,5	KQPNLEEISK
		1327,6	LKPD LIIADSSR
		1343,6	VDIVDRDWAR
		2080,9	GPYLQLDTEHLADLNPER
		2438,1	AGLLAHPNYSYVGQFLNELGFK
		2789,4	IVVLEYSFADALAALDVKPVGIADDGK
P29	35	760,5	AGWAEVK
		1012,6	TVDIPKDPK

ES 2 586 125 T3

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		1107,6	KDWEETTAK
		1204,7	VAPTVVVDYNK
		1238,6	YLEQQEMLGK
		1244,6	LYTYGDNWGR
		1259,7	IAVVAPTYAGGLK
		1281,7	GGEVLYQAFGLK
		1516,8	AGWAEVKQEEIEK
		1683,9	LGANIVAVNQVDQSK
		1877,1	EKPDLIIVYSTDKDIK
		1884,0	AIGQDATVSLDFEFDKK
		2227,1	VDAGTYWYNDPYTLDFMR
		2781,4	YAGDYIVSTSEKPTPGYESTNMWK
P30	33	834,5	QAIEFVK
		864,5	YIAQLEK
		946,5	QGTPEQMR
		962,5	QAIEFVKK
		976,5	DKFNDIPK
		1054,5	AMITSEGAFK
		1202,5	SNIETVHGSMK
		1268,6	HLLVETSVDKK
		1443,6	DIFGEVYDSIGK
		1450,7	TIQQTFFIDNDKK
		1454,7	VVTTNSILYDMAK
		1571,7	KDIFGEVYDSIGK
		1593,7	QDPHAWLSLDNGIK
		1818,9	DVKPIYLNAGEEGNKDK
		1836,9	DKQDPHAWLSLDNGIK
		1911,9	QYGITPGYIWEINTEK
		2582,3	LTDADVILYGLNLETGNGWFEK
		2710,2	KLTDADVILYGLNLETGNGWFEK
		2942,4	NVGGDNVDIHSIVPVGQDPHEYEYVKPK
<p>1. Peso molecular determinado por SDS-PAGE. 2. El valor de m/z de un fragmento polipeptídico se puede convertir en masa restando 1 al valor de m/z. Cada masa incluye un intervalo de más o menos 300 partes por millón (ppm), o de más o menos 1 Da.</p>			

ES 2 586 125 T3

Tabla 3. Características de los polipéptidos obtenidos del aislado SAAV1 de *S. aureus*

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
P33A	55	783,4	LHSWLK
		911,5	KLHSWLK
		937,5	TYTFHLR
		996,5	KFDGTGPFK
		1025,5	QAIGHMVNR
		1039,4	NDQYWGEK
		1178,5	GTDSLKDSLK
		1185,5	IYNSIDDAFK
		1222,6	DKYTVLNLK
		1229,5	ISTLIDNVKVK
		1346,6	AESLLDEAGWKK
		1355,5	EQAEYLQAEFK
		1381,6	VMPAGETAFLSMK
		1400,5	KGETNFAFTDDR
		1419,6	FHDGTPFDADAVK
		1422,6	NVTDINFDMPTR
		1483,6	EQAEYLQAEFKK
		1547,7	FHDGTPFDADAVKK
		1550,6	NVTDINFDMPTRK
		1559,7	LNINGETSDKIAER
		1787,9	EILDGQEKPATQLFAK
		1945,8	DESADFNKNDQYWGEK
		2239,0	VSFTQSQYELPFNEMQYK
		2354,1	QIDDEGIFIPISHGSMTWAPK
		2868,1	DIGDMNPHVYGGSMSAESMIYEPLVR
P33B	55	895,4	FPYAANGR
		904,5	ALLHASHR
		1045,5	EEGLAIKASK
		1384,5	GEAYFVDNNSLR
		1435,7	TIEADYVLVTVGR
		1669,8	RPNTDELGLEELGVK
		1841,0	NAIIATGSRPIEIPNFK
		2179,2	TSISNIYAIGDIVPGLPLAHK
		2546,2	FVEAQHSENLGVIAESVSLNFQK
		2587,3	VVGDFPIETDITIVIGAGPGGYVAAIR
P35	37	699,4	FEYIK

ES 2 586 125 T3

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		729,4	DAWPLK
		792,4	ASVVNFR
		852,4	VYDQLSK
		1008,4	LIDDLYEK
		1020,4	YKDAWPLK
		1074,4	EKEAEDLLK
		1083,5	LKPDLIVASK
		1169,5	FEYIKNDLK
		1182,4	KTESEWTSSK
		1184,4	YDDKVAAFQK
		1278,5	IAPTVSTDTVFK
		1558,7	QVDNGKDIIQLTSK
		1623,7	IVGQEPAPNLEEISK
		1712,7	ESIPLMNADHIFVVK
		1800,7	IYAGGYAGEILNDLGFK
		1956,8	IYAGGYAGEILNDLGFKR
		2251,9	NNQVSDDLDEITWNLGGYK
		3227,5	VVTLYQGATDVAVSLGKVPVGAVESWTQKPK
P38	33	864,5	YIAQLEK
		946,4	QGTPEQMR
		976,5	DKFNDIPK
		1054,5	AMITSEGAFK
		1146,5	FNDIPKEQR
		1268,6	HLLVETSVDKK
		1322,5	TIQQT FIDNDK
		1443,6	DIFGEVYTD SIGK
		1450,6	TIQQT FIDNDKK
		1454,6	VVTTNSILYDMAK
		1593,7	QDPHAWLSLDNGIK
		1818,9	DVKPIYLN GEEGNKDK
		1836,8	DKQDPHAWLSLDNGIK
		1911,9	QYGITPGYIWEINTEK
		2942,4	NVGGDNVDIHSIVPGQDPHEYEVKPK

1. Peso molecular determinado por SDS-PAGE.

2. El valor de m/z de un fragmento polipeptídico se puede convertir en masa restando 1 al valor de m/z. Cada masa incluye un intervalo de más o menos 300 partes por millón (ppm), o de más o menos 1 Da.

ES 2 586 125 T3

Tabla 4. Características de los polipéptidos obtenidos del aislado 2176 de *S. aureus*

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
P478	88	736,35	IIGDYR
		814,49	IFTDYR
		942,42	IFTDYRK
		945,36	TGNTPDGRK
		974,40	YAQVKPIR
		984,27	QMQFFGAR
		992,41	SMQPFGGIR
		1087,31	EQQLDVISR
		1097,31	VSGYAVNFIK
		1159,37	NHATAWQGFK
		1261,37	LWEQVMQLSK
		1289,46	AGVITGLPDAYGR
		1315,42	TSTFLDIYER
		1322,39	LREELSEQYR
		1394,37	THNQGVFDAYSR
		1417,52	KAGVITGLPDAYGR
		1426,36	IEMALHDTEIVR
		1487,39	NHATAWQGFKNGR
		1508,42	AGEPFAPGANPMHGR
		1513,52	VALYGVDFLMEEK
		1543,43	YGFDLRPAENFK
		1571,50	TSSIQYENDDIMR
		1636,56	KAGEPFAPGANPMHGR
		1859,80	DLETIVGVQTEKPFKR
		1876,77	TMATGIAGLSVAADSLSAIK
		2042,57	MHDFNTMSTEMSEDVIR
		2077,68	YGNDDRVDIAVDLVER
		2158,88	AGVITSEVQEIIDHFIMK
		2284,90	ETLIDAMEHPEEYPQLTIR
		2575,08	FLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVR
		2628,01	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFK
		2756,06	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFKK
		3262,33	VASTITSHDAGYLDKLETIVGVQTEKPFK
P479	80	625,27	HVDVR
		736,26	IIGDYR

ES 2 586 125 T3

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		814,22	IFTDYR
		942,27	IFTDYRK
		974,26	YAQVKPIR
		984,18	QMQFFGAR
		992,23	SMQPFGGIR
		1087,16	EQQLDIVISR
		1097,24	VSGYAVNFIK
		1159,12	NHATAWQGFK
		1243,14	VDDIAVDLVER
		1261,22	LWEQVMQLSK
		1272,24	SLGKEPEDQNR
		1277,18	DGISNTFSIVPK
		1289,21	AGVITGLPDAYGR
		1315,19	TSTFLDIYAER
		1322,21	LREELSEQYR
		1394,16	THNQGVFDAYS
		1417,32	KAGVITGLPDAYGR
		1426,23	IEMALHDTEIVR
		1487,19	NHATAWQGFKNGR
		1508,25	AGEPFAPGANPMHGR
		1513,21	VALYGVDFLMEEK
		1522,25	KTHNQGVFDAYS
		1543,26	YGFDLRPAENFK
		1571,23	TSSIQYENDDIMR
		1636,29	KAGEPFAPGANPMHGR
		1703,43	DLETIVGVQTEKPFK
		1751,45	EAVQWLYLAYLAAIK
		1859,53	DLETIVGVQTEKPFKR
		1876,50	TMATGIAGLSVAADSLSAIK
		1936,37	NEEGLVDFEIEGDFPK
		2042,43	MHDFNTMSTEMSEDVIR
		2077,45	YGNDDRVDIAVDLVER
		2158,57	AGVITSEVQEIIDHFIMK
		2284,61	ETLIDAMEHPPEYQLTIR
		2574,77	FLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVR
		2627,61	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFK

ES 2 586 125 T3

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		2755,70	SGAQVGNPFEGINSEVLEYDEVFKK
		2907,65	EFIQLNYTLYEGNDSFLAG PTEATSK
		3261,91	VASTITSHDAGYLDKDLLETIVGVQTEKPFK
		3421,02	TPDYNELFSGDPTWVTESIGGVGIDGRPLVTK
P480	65	625,35	HVDVR
		717,38	YSYER
		733,42	LPDNFK
		736,44	IIGDYR
		814,33	IFTDYR
		853,31	YGNDDR
		942,33	IFTDYRK
		944,39	ELKELGQK
		974,52	YAQVKPIR
		984,36	QMQFFGAR
		992,44	SMQPFGGIR
		1049,44	TLLYAINGGK
		1087,43	EQQLDVISR
		1097,51	VSGYAVNFIK
		1159,52	NHATAWQGFK
		1289,53	AGVITGLPDAYGR
		1315,51	TSTFLDIYAER
		1322,46	LREELSEQYR
		1394,50	THNQGVFDAYS
		1417,65	KAGVITGLPDAYGR
		1442,56	IEMALHDTEIVR + Oxidación (M)
		1467,60	VSGYAVNFIKLTR
		1522,61	KTHNQGVFDAYS
		1524,55	AGEPFAPGANPMHGR + Oxidación (M)
		1529,64	VALYGVDFLMEEK + Oxidación (M)
		1543,62	YGFDLSPAEENFK
		1652,68	KAGEPFAPGANPMHGR + Oxidación (M)
		1671,76	TSTFLDIYAERDLK
		1766,76	VDDIAVDLVERFMTK + Oxidación (M)
		1876,86	TMATGIAGLSVAADSLSAIK
		2077,93	YGNDDRVDDIAVDLVER
		2225,07	DSEHTMSVLTITSNVYGGK + Oxidación (M)

ES 2 586 125 T3

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		2575,33	FLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVR
		2628,25	SGAQVGNPFEGINSEVLEYDEVFK
		2748,36	NLTSMLDGYAMQCGHHLNINVFNR
		2756,63	SGAQVGNPFEGINSEVLEYDEVFKK
		3001,02	DEKSGAQVGNPFEGINSEVLEYDEVFK
		3420,75	TPDYNELFSGDPTWVTESIGGVGIDGRPLVTK
P481	55	634,33	AKSNSK
		883,24	TFYPEAR
		1014,24	QFWGHLVK
		1131,17	WIPLMMKGR
		1207,21	VINEEFEISK
		1324,10	NEDWQLYTAGK
		1360,28	TLLFGPFANVGPK
		1386,31	LDRPAIESSNER
		1565,30	IDEGTDVNFGELTR
		1584,34	EFINPLPHISYVR
		1699,29	EIEPDWNIHVYER
		1744,36	EPPGTPPMTVPHLDTR
		2046,52	QVTDYVFIGAGGGAIPLLQK
		2189,43	TFYPEARNEDWQLYTAGK
		2806,58	HLGGFPISGQFLACTNPQVIEQHDAK
P482	37	699,28	FEYIK
		729,26	DAWPLK
		792,33	ASWNFR
		852,28	VYDQLSK
		1008,30	LIDDLYEK
		1020,31	YKDAWPLK
		1083,43	LKPDIVASK
		1278,36	IAPTVSTDTVFK
		1623,44	IVGQEPAPNLEEiSK
		1712,62	ESIPLMNADHIFVVK
		1800,61	IYAGGYAGEILNDLGFK
		1956,77	IYAGGYAGEILNDLGFKR
		2251,77	NNQVSDDLDEITWNLGGYK
		3227,44	VVTLYQGATDVAVSLGVKPVGAVESWTQKPK
P483	36	646,50	DVWAR

ES 2 586 125 T3

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		672,41	KLNAVK
		716,41	VDIVDR
		725,61	IIKPVR
		842,50	IAPTLSLK
		850,47	QNINSFK
		1068,50	IGDYTSVGTR
		1075,42	MIIMTDHAK + Oxidación (M)
		1185,53	KQPNLEEISK
		1327,59	LKPDIIADSSR
		1343,58	VDIVDRDVWAR
		1592,76	LKPDIIADSSRHK
		2081,00	GPYLQLDTEHLADLNPER
		2438,24	AGLLAHPNYSYVGQFLNELGFK
		2789,48	IVVLEYSFADALAALDVKPVGIADDGK
		2917,60	IVVLEYSFADALAALDVKPVGIADDGKK
P484	35	857,38	AAAIDLAGR
		1022,23	NIEADTGMR + Oxidación (M)
		1056,32	VVDANIAAQR
		1075,36	ADIDLPPER
		1285,44	LVGGAGEETIAR
		1435,44	AMAVATEQEMKAR
		1632,50	HHTEVLENPDNISK
		1813,65	VVEAESEVPLAMAEALR
		1887,67	VIETPFIAGVAMNGIEVK
		2299,85	AGLALTTNQLESHYLAGGNVDR
		2806,95	TVLSKGLDSGTAFEILSIDIADVDSK
		3337,42	AGLALTTNQLESHYLAGGNVDRVVDANIAAQR
P485	33	625,28	ADYEK
		864,28	YIAQLEK
		946,23	QGTPEQMR
		1045,26	ALEQAGKSLK
		1268,35	HLLVETSVDKK
		1443,34	DIFGEVYTD SIGK
		1450,40	TIQQT FIDNDKK
		1454,37	VVTTNSILYDMAK
		1571,45	KDIFGEVYTD SIGK

ES 2 586 125 T3

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		1576,44	DVKPIYLNAGEEGNK
		1593,47	QDPHAWLSLDNGIK
		1819,59	DVKPIYLNAGEEGNKDK
		1836,62	DKQDPHAWLSLDNGIK
		1911,66	QYGITPGYIWEINTEK
		2172,83	VIAVSKDVKPIYLNAGEEGNK
		2582,00	LTDADVILYGLNLETGNGWFEK
		2942,26	NVGGDNVDIHSIVPVGQDPHEYEVKPK
P486	32	625,42	ADYEK
		864,41	YIAQLEK
		1268,48	HLLVETSVDKK
		1443,49	DIFGEVYTDTSIGK
		1450,53	TIQQTFFIDNDKK
		1454,61	VVTTNSILYDMAK
		1576,64	DVKPIYLNAGEEGNK
		1593,57	QDPHAWLSLDNGIK
		1818,77	DVKPIYLNAGEEGNKDK
		1836,78	DKQDPHAWLSLDNGIK
		1911,81	QYGITPGYIWEINTEK
		2582,18	LTDADVILYGLNLETGNGWFEK
		2942,32	NVGGDNVDIHSIVPVGQDPHEYEVKPK

1. Peso molecular determinado por SDS-PAGE.
 2. El valor de m/z de un fragmento polipeptídico se puede convertir en masa restando 1 al valor de m/z. Cada masa incluye un intervalo de más o menos 400 partes por millón (ppm) o 1 Da.

Tabla 5. Características de los polipéptidos obtenidos del aislado bovino 1477 de *S. aureus*

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
P487	88	717,39	YSYER
		736,52	IIGDYR
		814,46	IFTDYR
		942,46	IFTDYRK
		974,54	YAQVKPIR
		984,41	QMQFFGAR
		992,40	SMQPFGGIR
		1087,49	EQQLDVISR
		1097,50	VSGYAVNFIK

ES 2 586 125 T3

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		1159,39	NHATAWQGFK
		1261,45	LWEQVMQLSK
		1272,50	SLGKEPEDQNR
		1277,50	DGISNTFSIVPK
		1289,54	AGVITGLPDAYGR
		1315,54	TSTFLDIYAER
		1322,53	LREELSEQYR
		1394,50	THNQGVFDAYS
		1417,62	KAGVITGLPDAYGR
		1426,65	IEMALIDTEIVR
		1508,59	AGEPFAPGANPMHGR
		1522,61	KTHNQGVFDAYS
		1543,68	YGFDLRPAENFK
		1877,74	TMATGIAGLSVAADSLSAIK
		2077,86	YGNDDRVDIAVDLVER
		2159,08	AGVITSEVQEIIDHFIMK
		2285,07	ETLIDAMEHPPEEYPQLTIR
		2575,32	FLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVR
		2628,24	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFK
		2756,41	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFKK
		3262,68	VASTITSHDAGYLDKDLTIVGVQTEKPFK
P488	80	625,49	HVDVR
		814,54	IFTDYR
		942,66	IFTDYRK
		974,69	YAQVKPIR
		984,59	QMQFFGAR
		992,55	SMQPFGGIR
		1159,64	NHATAWQGFK
		1261,63	LWEQVMQLSK
		1272,74	SLGKEPEDQNR
		1277,69	DGISNTFSIVPK
		1289,76	AGVITGLPDAYGR
		1315,73	TSTFLDIYAER
		1322,72	SMQPFGGIRMAK
		1394,73	THNQGVFDAYS
		1417,86	KAGVITGLPDAYGR

ES 2 586 125 T3

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		1422,76	TLLYAINGGKDEK
		1426,80	IEMALHDTEIVR
		1508,82	AGEPFAPGANPMHGR
		1513,80	VALYGVDFLMEEK
		1543,82	YGFDLRPAENFK
		1571,82	TSSIQYENDDIMR
		1703,99	DLETIVGVQTEKPFK
		1860,23	DLETIVGVQTEKPFKR
		1877,07	TMATGIAGLSVAADSLSAI K
		1937,09	NEEGLVVDFEIEGDFPK
		2078,13	YGNNDDRVDDIAVDLVER
		2575,56	FLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVR
		2628,30	SGAQVGPNFEGINSEVLEYDEVFK
		2908,63	EFIQLNYTLYEGNDSFLAGPTEATSK
P489	65	733,67	IVKFAR
		944,71	ELKELGQK
		974,79	YAQVKPIR
		984,69	QMQFFGAR
		1049,83	TLLYAINGGK
		1087,78	EQQLDVISR
		1097,79	VSGYAVNFIK
		1243,80	VDDIAVDLVER
		1272,82	SLGKEPEDQNR
		1289,87	AGVITGLPDAYGR
		1299,92	LPDNFKTYCAK
		1315,83	TSTFLDIYAER
		1322,84	SMQPFGGIRMAK
		1390,93	DQKGALSSLSSVAK
		1394,84	THNQGVFDAYS R
		1577,94	VASTITSHDAGYLDK
		1637,09	KAGEPFAPGANPMHGR
		1704,16	DLETIVGVQTEKPFK
		2030,42	MSIKTSSIQYENDDIMR
		2078,34	YGNNDDRVDDIAVDLVER
		2284,60	ETLIDAMEHPPEEYPQLTIR
		2575,77	FLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVR

ES 2 586 125 T3

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		2628,64	SGAQVGPNFEGINSEVLEYDEVFK
P490	55	883,81	TFYPEAR
		1014,87	QFWGHLVK
		1131,97	WIPLMMKGR
		1207,99	VINEEFEISK
		1231,97	YSFDQVIMTK
		1325,02	NEDWQLYTAGK
		1361,17	TLLFGPFANVGPK
		1362,14	GREDNPGIMAASK + Oxidación (M)
		1387,14	LDRPAIESSNER
		1481,24	NEDWQLYTAGKR
		1566,28	IDEGTDVNFGE LTR
		1585,34	EFINPLPHISYVR
		1700,36	EIEPDWNIHVYER
		1761,49	EPPGTPPMTVPHLDTR + Oxidación (M)
		2047,67	QVTDYVFIGAGGGAIPLLQK
		2208,82	VYGKEPPGTPPMTVPHLDTR + Oxidación (M)
		2865,21	HLGGFPISGQFLACTNPQVIEQHDAK
P492	36	857,57	AAAILAGR
		1056,59	VVDANIAAQR
		1075,61	ADIDLPER
		1285,74	LVGGAGEETIIAR
		1632,95	HHTEVLEPNPDISK
		1814,09	VVEAESEVPLAMAEALR
		2284,45	AAAILAGRDVLEAVQMSVNPK + Oxidación (M)
		2300,40	. AGLALTTNQLESHYLAGGNVDR
		2807,80	TVLSKGLDSGTAFEILSIDIADVDISK
P493	35	762,46	FVFHGR
		964,39	DGFNNIER
		1363,56	GHVYNGISGGQFK
		1443,56	YTPTSILYFNPK
		1450,64	QLAEDLQKHLGAK
		1819,88	NHSEYVTDMLIGIR + Oxidación (M)
		1875,84	DLPPMEQVFDLTLDDK
		1941,00	IRPEDMHIMANIFLPK + Oxidación (M)

Designación del polipéptido	Peso molecular aproximado en kilodalton (kDa) ¹	Valor de m/z de los fragmentos polipeptídicos procedentes de la digestión con tripsina ²	Secuencia de aminoácidos predicha del fragmento polipeptídico
		2081,10	RIRPEDMHIMANIFLPK
		2283,30	ISHLVLTRTGLYIIDSQLLK
P495	32		

1. Peso molecular determinado por SDS-PAGE.
 2. El valor de m/z de un fragmento polipeptídico se puede convertir en masa restando 1 al valor de m/z. Cada masa incluye un intervalo de más o menos 430 partes por millón (ppm) o 1 Da.

En otro aspecto más, la presente divulgación incluye además polipéptidos que tienen similitud con una secuencia de aminoácidos. La similitud se refiere a similitud estructural y, en general, se determina mediante la alineación de los restos de las dos secuencias de aminoácidos (es decir, una secuencia de aminoácidos candidata y una secuencia de aminoácidos de referencia) para optimizar el número de aminoácidos idénticos a lo largo de sus secuencias. Están permitidos los huecos en una o en ambas secuencias en la fabricación de la alineación para optimizar el número de aminoácidos idénticos, aunque los aminoácidos de cada secuencia deben permanecer sin embargo en su orden correcto. Las secuencias de aminoácidos de referencia se desvelan en las Tablas 6, 7, 8 y 9. Se pueden comparar dos secuencias de aminoácidos usando algoritmos disponibles en el mercado. Preferentemente, las dos secuencias de aminoácidos se comparan usando el programa BLASTP del algoritmo de búsqueda BLAST 2, según lo descrito por Tatusova *et al.*, (*FEMS Microbiol Lett* 1999, 174:247-250), y que se puede obtener en Internet, por ejemplo, en el sitio de Internet mantenido por el Centro Nacional de Información sobre Biotecnología, Institutos Nacionales de Salud. Preferentemente, se usan los valores por defecto para todos los parámetros de búsqueda de BLAST 2, incluyendo la matriz = BLOSUM62; la penalización por apertura de hueco = 11; la penalización por extensión de hueco = 1; hueco x_dropoff = 50; esperado = 10; tamaño de palabra = 3; y opcionalmente, con el filtro activado. En la comparación de dos secuencias de aminoácidos usando el algoritmo de búsqueda BLAST, la similitud estructural se denomina "identidades". Preferentemente, una secuencia de aminoácidos candidata tiene una identidad del al menos 80 %, identidad del al menos 90 %, identidad del al menos 95 %, identidad del al menos 96 %, identidad del al menos 97 %, identidad del al menos 98 % o identidad del al menos 99 % con una secuencia de aminoácidos de referencia. Preferentemente, el peso molecular de la secuencia de aminoácidos candidata y la secuencia de aminoácidos de referencia son esencialmente el mismo valor. Preferentemente, el peso molecular de la secuencia de aminoácidos candidata y la secuencia de aminoácidos de referencia se determina por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Se puede obtener un polipéptido candidato mediante el crecimiento de un microbio en condiciones de bajo nivel de metal y el posterior aislamiento de un polipéptido mediante los procedimientos desvelados en el presente documento.

Por lo general, una secuencia de aminoácidos candidata que tiene similitud estructural con una secuencia de aminoácidos de referencia tiene actividad inmunogénica, actividad inmunogénica protectora, actividad seroactiva, actividad inmunorreguladora o una combinación de los mismos.

Tabla 6. Aislado ATCC 19636 de *S. aureus*

Peso molecular del polipéptido de referencia (kDa) ¹	Identificador de secuencia del NCBI del polipéptido identificado por el algoritmo informático como el de mejor coincidencia con el identificador genético de masa del polipéptido de referencia
88	49243545
55	81762012
38	82750440
37	49243435
36	57286380
35	49245508
33	49243946

1. Peso molecular determinado por SDS-PAGE.

Tabla 7. SAAV1 de *S. aureus*

Peso molecular del polipéptido de referencia (kDa) ¹	Identificador de secuencia del NCBI del polipéptido identificado por el algoritmo informático como el de mejor coincidencia con el identificador genético de masa del polipéptido de referencia
55	57286470
55	48874
37	49243435
33	49243946

1. Peso molecular determinado por SDS-PAGE.

Tabla 8. 2176 de *S. aureus*

Peso molecular del polipéptido de referencia (kDa) ¹	Identificador de secuencia del NCBI del polipéptido identificado por el algoritmo informático como el de mejor coincidencia con el identificador genético de masa del polipéptido de referencia
88	57285406
80	57285406
65	57285406
55	57286528
37	49482358
36	57286380
35	15927153
33	57285658
32	57285658

1. Peso molecular determinado por SDS-PAGE.

5

Tabla 9. 1477 de *S. aureus*

Peso molecular del polipéptido de referencia (kDa) ¹	Identificador de secuencia del NCBI del polipéptido identificado por el algoritmo informático como el de mejor coincidencia con el identificador genético de masa del polipéptido de referencia
88	49482458
80	57285406
65	57285406
55	57286528
36	15927153
35	49484031

1. Peso molecular determinado por SDS-PAGE.

10

Los polipéptidos expresados por un microbio de referencia y mencionados anteriormente en peso molecular se pueden obtener mediante el crecimiento del microbio de referencia en condiciones de bajo nivel de metal y el posterior aislamiento de un polipéptido mediante los procesos desvelados en el presente documento. Un polipéptido candidato se puede aislar de un microbio, preferentemente de un microbio gram positivo, más preferentemente, de un miembro de la familia *Micrococcaceae*, preferentemente, *Staphylococcus* sp., más preferentemente, *Staphylococcus aureus*. Otros microbios gram positivos incluyen *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix* sp., *Mycobacterium* sp., y *Erysipelothrix* sp. Un polipéptido candidato también se puede producir usando técnicas recombinantes, enzimáticas o químicas.

15

La presente divulgación también proporciona preparados de células enteras de un microbio, donde el microbio expresa uno o más de los polipéptidos de la presente divulgación. Las células presentes en un preparado de células enteras están preferentemente inactivadas de modo que las células no se pueden replicar, pero la actividad inmunogénica de los polipéptidos de la presente divulgación expresados por el microbio se mantiene. Por lo general,

las células se destruyen mediante la exposición a agentes tales como glutaraldehído, formalina o formaldehído.

Composiciones

5 Una composición de la presente invención es como se define en las reivindicaciones. Las composiciones de la presente divulgación pueden incluir al menos un polipéptido descrito en el presente documento, o una serie de polipéptidos, es decir, un número entero superior a 1 (por ejemplo, al menos 2, al menos 3, al menos 4). Por ejemplo, una composición puede incluir 2, 3, 4, 5 o más polipéptidos regulados por el nivel de metal aislados que tienen pesos moleculares de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa, 33 kDa, o cualquier subconjunto o combinación de los mismos. Una composición puede incluir polipéptidos que se pueden aislar de 1 microbio, o que se pueden aislar de una combinación de 2 o más microbios. Por ejemplo, una composición puede incluir polipéptidos que se pueden aislar de 2 o más especies de *Staphylococcus* o de una especie de *Staphylococcus* y un microbio diferente que no forme parte del género *Staphylococcus*. La presente divulgación también proporciona composiciones que incluyen un preparado de células enteras, en el que la célula entera expresa uno o más de los polipéptidos de la presente divulgación. Por ejemplo, la célula entera puede ser una especie de *Staphylococcus*. En algunos aspectos, una composición puede incluir preparados de células enteras de 2, 3, 4, 5 o 6 cepas.

Opcionalmente, un polipéptido de la composición de la presente invención puede estar unido covalentemente o conjugado con un polipéptido portador para mejorar las propiedades inmunológicas del polipéptido. Los polipéptidos portadores útiles son conocidos en la técnica. El acoplamiento químico de los polipéptidos de la presente divulgación puede llevarse a cabo usando métodos conocidos y habituales. Por ejemplo, pueden usarse diversos reactivos reticuladores homobifuncionales y/o heterobifuncionales tales como bis(sulfosuccinimidil)suberato, bis(diazobenzidina), dimetil-adipimidato, dimetil-pimelimidato, dimetil-superimidato, disuccinimidil-suberato, glutaraldehído, *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida, sulfo-*m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida, sulfosuccinimidil 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, sulfosuccinimidil-4-(*p*-maleimido-fenil)butirato y (1-etil-3-(dimetilaminopropil)carbodiimida (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", en general y Capítulo 5, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, NY (1988)).

Las composiciones de la presente invención opcionalmente incluyen además un vehículo farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, vehículo, excipiente, sal, etc. que es compatible con los otros ingredientes de la composición, y no perjudicial para el receptor del mismo. Por lo general, la composición incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable cuando la composición se usa como se describe en el presente documento. Las composiciones de la presente invención se pueden formular en preparados farmacéuticos en varias formas adaptadas a la vía de administración seleccionada, incluyendo las vías adecuadas para estimular una respuesta inmune hacia un antígeno. Así pues, una composición de la presente invención se puede administrar por vías conocidas incluyendo, por ejemplo, oral; parental incluyendo intradérmica, transcutánea y subcutánea; intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, etc., y tópicamente, tal como intranasal, intrapulmonar, intramamaria, intravaginal, intrauterina, intradérmica, transcutánea y rectal etc. Se prevé que una composición se puede administrar en una superficie mucosa, tal como por administración en la mucosa nasal o respiratoria (por ejemplo, pulverizado o aerosol), para estimular la inmunidad mucosa, tal como la producción de anticuerpos IgA secretores, por todo el cuerpo del animal.

Una composición de la presente invención también se puede administrar por medio de un implante de liberación sostenida o retardada. Los implantes adecuados para su uso de acuerdo con la invención son conocidos e incluyen, por ejemplo, los desvelados en Emery y Straub (documento WO 01/37810 (2001)), y Emery *et al.* (documento WO 96/01620 (1996)). Los implantes se pueden producir en tamaños suficientemente pequeños para su administración por aerosol o pulverizado. Los implantes también incluyen nanoesferas y microesferas.

Una composición de la presente invención se puede administrar en una cantidad suficiente para tratar ciertas afecciones como se describe en el presente documento. La cantidad de polipéptidos o células enteras presentes en una composición de la presente invención puede variar. Por ejemplo, la dosis de polipéptidos puede ser de entre 0,01 microgramos (μg) y 300 mg, normalmente de entre 0,1 mg y 10 mg. Cuando la composición es un preparado de células enteras, las células pueden estar presentes a una concentración de, por ejemplo, 10^2 bacterias/ml, 10^3 bacterias/ml, 10^4 bacterias/ml, 10^5 bacterias/ml, 10^6 bacterias/ml, 10^7 bacterias/ml, 10^8 bacterias/ml o 10^9 bacterias/ml. Para una composición inyectable (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, etc.) los polipéptidos pueden estar presentes en la composición en una cantidad tal que el volumen total de la composición administrada sea de 0,5 ml a 5,0 ml, normalmente de 1,0-2,0 ml. Cuando la composición es un preparado de células enteras, las células están presentes preferentemente en la composición en una cantidad de modo que el volumen total de la composición administrada sea de 0,5 ml a 5,0 ml, normalmente 1,0-2,0 ml. La cantidad administrada variará dependiendo de varios factores incluyendo, pero sin limitación, los polipéptidos específicos seleccionados, el peso, el estado físico y la edad del animal, y la vía de administración. Por lo tanto, el peso absoluto del polipéptido incluido en una forma de dosificación unitaria dada puede variar ampliamente, y depende de factores tales como la especie, la edad, el peso y el estado físico del animal, así como del método de administración. Dichos factores pueden ser determinados por un experto en la materia. Otros ejemplos de dosis adecuadas para la invención se desvelan en Emery *et al.*, (Patente de EE.UU. n.º 6.027.736).

Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en formas de dosis unitarias, y se pueden preparar mediante métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Los métodos de preparación de una composición con un vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen la etapa de asociar el compuesto activo (por ejemplo, un polipéptido o una célula entera de la presente divulgación) con un vehículo que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el compuesto activo con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto en las formulaciones deseadas.

Una composición que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir también un adyuvante. Un "adyuvante" se refiere a un agente que puede actuar en un modo no específico para mejorar una respuesta inmune hacia un determinado antígeno, reduciendo así potencialmente la cantidad de antígeno necesaria en una composición inmunizadora dada y/o la frecuencia de inyección necesaria para generar una respuesta inmune adecuada hacia el antígeno de interés. Los adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, IL-1, IL-2, emulsionantes, dipéptidos de muramilo, bromuro de dimetilidicradecilamonio (DDA), avridina, hidróxido de aluminio, aceites, saponinas, alfa-tocoferol, polisacáridos, parafinas emulsionadas (incluyendo por ejemplo, las disponibles con la marca comercial EMULSIGEN de MVP Laboratories, Ralston, Nebraska), ISA-70, RIBI y otras sustancias conocidas en la técnica. Se espera que los polipéptidos de la composición de la presente invención tengan actividad inmunorreguladora y que dichos polipéptidos se puedan usar como adyuvantes que actúen directamente como activadores de los linfocitos T y/o B o que actúen en ciertos tipos de células para aumentar la síntesis de diversas citocinas o activar las vías de señalización intracelular. Se espera que dichos polipéptidos aumenten la respuesta inmune para aumentar el índice protector de la composición existente.

En otra realización, una composición de la invención que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, IL-2, IL-4 y/o IL-6, TNF, IFN-alfa, IFN-gamma, y otras citocinas que afectan a las células inmunes. Una composición inmunizadora también puede incluir otros componentes conocidos en la técnica tales como un antibiótico, un conservante, un antioxidante o un agente quelante.

Métodos de preparación

La presente divulgación también proporciona métodos de obtención de los polipéptidos descritos en el presente documento. Los polipéptidos y las células enteras descritos en el presente documento se pueden aislar de un miembro de la familia *Micrococcaceae*, preferentemente, *Staphylococcus* sp., más preferentemente, *Staphylococcus aureus*. Otros microbios gram positivos de los que se pueden aislar los polipéptidos incluyen *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix* sp., *Mycobacterium* sp., y *Erysipelothrix* sp. Los microbios útiles para la obtención de polipéptidos de la presente divulgación y la fabricación de preparados de células enteras se encuentran disponibles en el mercado, en un depósito tal como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). Además, dichos microbios se pueden obtener fácilmente mediante técnicas habituales y conocidas en la materia. Los microbios pueden obtenerse de un animal infectado como un aislado de campo, y usarse para obtener polipéptidos y/o preparados de células enteras de la presente divulgación, o almacenarse para su uso futuro, por ejemplo, en un depósito congelado a una temperatura de -20 °C a -95 °C o de -40 °C a -50 °C, en medios bacteriológicos que contengan glicerol al 20 % y otros medios similares.

Cuando un polipéptido de la presente divulgación se ha de obtener de un microbio, el microbio puede incubarse en condiciones de bajo nivel de metal. Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones de bajo nivel de metal" se refiere a un entorno, normalmente medios bacteriológicos, que contiene cantidades de un metal libre que hacen que un microbio exprese polipéptidos regulados por el nivel de metal a un nivel detectable. Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones de alto nivel de metal" se refiere a un entorno que contiene cantidades de un metal libre que hacen que un microbio bien no exprese uno o más de los polipéptidos regulados por el nivel de metal descritos en el presente documento a un nivel detectable, o reduzca la expresión de dicho polipéptido. Los metales son los presentes en la tabla periódica, en los Grupos 1 a 17 (notación IUPAC; también denominados Grupos I-A, II-A, III-B, IV-B, V-B, VI-B, VII-B, VIII, I-B, II-B, III-A, IV-A, V-A, VI-A y VII-A, respectivamente, con la notación CAS). Preferentemente, los metales son los de los Grupos 2 a 12, más preferentemente, Grupos 3-12. Incluso más preferentemente, el metal es hierro, cinc, cobre, magnesio, níquel, cobalto, manganeso, molibdeno o selenio, más preferentemente, hierro.

En general, las condiciones de bajo nivel de metal son el resultado de la adición de un compuesto quelante de metales a un medio bacteriológico, el uso de un medio bacteriológico que contiene bajas cantidades de un metal o la combinación de los mismos. En general, las condiciones de alto nivel de metal están presentes cuando un quelante no está presente en el medio, se añade un metal al medio o la combinación de los mismos. Los ejemplos de quelantes de metales incluyen compuestos naturales y sintéticos. Los ejemplos de compuestos naturales incluyen compuestos fenólicos vegetales tales como flavonoides. Los ejemplos de flavonoides incluyen los quelantes de cobre catequina y naringenina, y los quelantes de hierro miricetina y quercetina. Los Ejemplos de quelantes de cobre sintéticos incluyen, por ejemplo, tetraamilomolibdato, y los ejemplos de quelantes de cinc sintéticos incluyen, por ejemplo, *N,N,N',N'*-tetraquis(2-piridilmetil)-etilendiamina. Los ejemplos de quelantes de hierro sintéticos incluyen 2,2'-dipiridilo (también denominado en la técnica V,V'-bipiridilo), 8-hidroxiquinolina, ácido etilendiamina-di-O-

hidroxifenilacético (EDDHA), metanosulfonato de desferrioxamina (desferol), transferrina, lactoferrina, ovotransferrina, sideróforos biológicos tales como los catecolatos e hidroxamatos, y citrato. Un ejemplo de un quelante de cationes divalentes general es la resina Chelex®. Preferentemente, el 2,2'-dipiridilo se usa para la quelación del hierro. Por lo general, se añade 2,2'-dipiridilo al medio a una concentración de al menos 300 microgramos/mililitro ($\mu\text{g/ml}$), al menos 600 $\mu\text{g/ml}$ o al menos 900 $\mu\text{g/ml}$. Los niveles altos de 2,2'-dipiridilo pueden ser de 1.200 $\mu\text{g/ml}$, 1.500 $\mu\text{g/ml}$ o 1.800 $\mu\text{g/ml}$.

El genoma de *S. aureus* codifica tres homólogos de Fur: Fur, PerR y Zur. Mientras que las proteínas Zur y PerR parecen estar principalmente implicadas en la regulación de la homeostasis del cinc y los genes del estrés del peróxido, respectivamente, se ha demostrado que la proteína Fur regula varios sistemas de captación del sideróforo del hierro en respuesta a la limitación del hierro. La proteína Fur también desempeña un papel en la resistencia al estrés oxidativo y la virulencia. Se espera que un organismo gram positivo, preferentemente, un *S. aureus*, con una mutación en un gen *fur* dé lugar a la expresión constitutiva de muchos, si no todos, los polipéptidos regulados por el nivel de metal de la presente divulgación. La producción de una mutación de *fur* en un organismo gram positivo, preferentemente, un *S. aureus*, se puede producir usando métodos habituales, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis de transposón, química o dirigida útil para generar mutaciones de desactivación de genes en bacterias gram positivas.

El medio usado para incubar el microbio y el volumen de los medios usado para incubar el microbio puede variar. Cuando se está evaluando un microbio para determinar la capacidad de producir uno o más de los polipéptidos descritos en el presente documento, el microbio se puede cultivar en un volumen adecuado, por ejemplo, de 10 mililitros de 1 litro de medio. Cuando un microbio se cultiva para obtener polipéptidos para su uso en, por ejemplo, la administración a animales, el microbio puede cultivarse en un fermentador para permitir el aislamiento de grandes cantidades de polipéptidos. Los métodos para el cultivo de microbios en un fermentador son habituales y conocidos en la técnica. Las condiciones usadas para el cultivo de un microbio incluyen preferentemente un quelante de metal, más preferentemente un quelante del hierro, por ejemplo, 2,2'-dipiridilo, un pH de entre 6,5 y 7,5, preferentemente de entre 6,9 y 7,1, y una temperatura de 37 °C.

En algunos aspectos de la invención, un microbio se puede recoger tras el crecimiento. La recogida incluye concentrar el microbio en un volumen más pequeño y suspenderlo en un medio diferente al medio de crecimiento. Los métodos de concentración de un microbio son habituales y conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, filtración o centrifugación. Por lo general, el microbio concentrado se suspende en un tampón apropiado. Un ejemplo de un tampón que se puede usar contiene Tris-base (7,3 gramos/litro), a un pH de 8,5. Opcionalmente, el tampón final también minimiza la degradación proteolítica. Esto se puede lograr teniendo el tampón final a un pH superior a 8,0, preferentemente, de al menos 8,5, y/o incluyendo uno o más inhibidores de proteinasas (por ejemplo, fluoruro de fenilmetanosulfonilo). Opcional y preferentemente, el microbio concentrado se congela a -20 °C o a una temperatura inferior hasta que se altera.

En un aspecto de la divulgación, el microbio es para su uso como un preparado de células enteras, y las células recogidas se pueden procesar usando métodos habituales y conocidos para inactivar células. Para preparar la composición de la presente invención, el *S. aureus* se puede alterar usando métodos químicos, físicos o mecánicos habituales y conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ebullición, prensa francesa, sonicación, digestión de peptidoglicano (por ejemplo, por digestión con lisozima) u homogenización. Un ejemplo de un dispositivo adecuado útil para la homogenización es un Homogeneizador modelo C500-B Avestin, (Avestin Inc, Ottawa Canadá). Como se usa en el presente documento, "alteración" se refiere a la ruptura de la célula. La alteración de un microbio se puede medir mediante métodos que son habituales y conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, cambios en la densidad óptica. Por lo general, un microbio se somete a la alteración hasta que el porcentaje de transmitancia se aumenta en un 20 % cuando se mide la dilución de 1:100. Cuando se usan métodos físicos o mecánicos, la temperatura durante la alteración normalmente se mantiene baja, preferentemente a 4 °C, para minimizar aún más la degradación proteolítica. Cuando se usan métodos químicos, la temperatura se puede aumentar para optimizar la alteración de las células. También se puede usar una combinación de métodos químicos, físicos y mecánicos para solubilizar la pared celular del microbio. Como se usa en el presente documento, el término "solubilizar" se refiere a disolver los materiales celulares (por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono) en la fase acuosa del tampón en el que se alteró el microbio, y la formación de agregados de materiales celulares insolubles. Sin el deseo de quedar limitados por la teoría, se cree que las condiciones de solubilización dan lugar a la agregación de polipéptidos de la presente invención en agregados insolubles que sean lo suficientemente grandes como para permitir el aislamiento fácil mediante, por ejemplo, centrifugación.

Los agregados insolubles que incluyen uno o más de los polipéptidos se pueden aislar mediante métodos que son habituales y conocidos en la técnica. Preferentemente, los agregados insolubles se aíslan por centrifugación. Por lo general, la centrifugación de polipéptidos, tales como polipéptidos de membrana, se puede realizar mediante fuerzas centrífugas de 100.000 x g. El uso de dichas fuerzas centrífugas requiere el uso de ultracentrifugadores, y el aumento a escala para procesar grandes volúmenes de muestra suele ser difícil y no es económico con estos tipos de centrifugadores. Los métodos descritos en el presente documento proporcionan la producción de agregados insolubles lo suficientemente grandes como para permitir el uso de centrifugadores de flujo continuo, por ejemplo, Sharples T-1 (Alfa Laval Separations, Warminster, PA), que se pueden usar con un caudal de 250 ml/minuto en

117,21 kPa (17 psi) a una fuerza centrífuga de 46.000 x g a 60.000 x g. Se pueden usar otros centrifugadores de gran escala tales como las configuraciones de recipiente tubular, cámara y disco. Dichos centrifugadoras se usan habitualmente y se conocen en la técnica, y están disponibles en el mercado en fabricantes tales como Pennwalt, Westfalia y alfa-Laval.

Las proteínas recogidas finales se lavan y/o se someten a diálisis frente a un tampón apropiado usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, diafiltración, precipitación, cromatografía hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de afinidad, o la ultrafiltración y el lavado de los polipéptidos, por ejemplo, en alcohol, mediante diafiltración. Después del aislamiento, los polipéptidos se suspenden en tampón y se almacenan a baja temperatura, por ejemplo, a -20 °C o temperatura inferior.

En los aspectos de la presente divulgación en los que se debe fabricar un preparado de células enteras, tras el cultivo, el microbio se puede destruir mediante la adición de un agente tal como glutaraldehído, formalina o formaldehído, a una concentración suficiente para inactivar las células en el cultivo. Por ejemplo, se puede añadir formalina a una concentración del 0,3 % (vol:vol). Tras un período de tiempo suficiente para inactivar las células, las células se pueden recoger, por ejemplo, mediante diafiltración y/o centrifugación, y lavarse.

Métodos de uso

Las composiciones de la presente invención se pueden usar en diversos métodos, según lo desvelado en el presente documento. Los métodos incluyen administrar a un animal una cantidad eficaz de una composición de la presente invención. El animal puede ser, por ejemplo, aviar (incluyendo, por ejemplo, pollos o pavos), bovino (incluyendo, por ejemplo, ganado), caprino (incluyendo, por ejemplo, cabras), ovino (incluyendo, por ejemplo, ovejas), porcino (incluyendo, por ejemplo, cerdos), bisonte (incluyendo, por ejemplo, búfalo), equino (incluyendo, por ejemplo, caballos), un animal de compañía (incluyendo, por ejemplo, perros o gatos), miembros de la familia *Cervidae* (incluyendo, por ejemplo, ciervos, alces, caribúes y renos) o ser humano.

En algunos aspectos, los métodos pueden incluir además administraciones adicionales (por ejemplo, una o más administraciones de refuerzo) de la composición al animal para mejorar o estimular una respuesta inmune secundaria. Se puede administrar un refuerzo en un momento después de la primera administración, por ejemplo, de 1 a 8 semanas, preferentemente de 2 a 4 semanas, después de la primera administración de la composición. Se pueden administrar refuerzos posteriores una, dos, tres, cuatro o más veces al año. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se espera que, en algunos aspectos de la presente invención, no sean necesarios refuerzos anuales, pues el animal se expondrá en el campo a microbios que expresen polipéptidos presentes en las composiciones que tengan epítomos que sean idénticos o estén relacionados estructuralmente con los epítomos presentes en los polipéptidos de la composición administrada al animal.

En un aspecto, la divulgación se dirige a métodos de fabricación de anticuerpos, por ejemplo, mediante la inducción de la producción de anticuerpos en un animal o mediante técnicas recombinantes. El anticuerpo producido incluye el anticuerpo que se une específicamente al menos a un polipéptido presente en la composición. En este aspecto de la divulgación, una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz para dar lugar a la producción de anticuerpos en el animal. Los métodos para determinar si un animal ha producido anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos presentes en una composición de la presente invención se pueden determinar como se describe en el presente documento. La presente divulgación incluye además anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de la presente divulgación, y composiciones que incluyen dichos anticuerpos. El método se puede usar para producir el anticuerpo que se une específicamente a polipéptidos expresados por un microbio que no sea el microbio del que se aislaron los polipéptidos de la composición. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que puede "unirse específicamente" a un polipéptido es un anticuerpo que interactúa con el epítomo del antígeno que indujo la síntesis del anticuerpo, o interactúa con un epítomo relacionado estructuralmente. Al menos algunos de los polipéptidos presentes en las composiciones de la presente invención normalmente incluyen epítomos que se conservan en los polipéptidos de diferentes especies y diferentes géneros de los microbios. Por consiguiente, se espera que los anticuerpos producidos usando una composición derivada de un microbio se unan a polipéptidos expresados por otros microbios y proporcionen protección de amplio espectro contra organismos gram positivos. Los ejemplos de microbios gram positivos a los que el anticuerpo puede unirse específicamente son *Micrococcaceae*, preferentemente, *Staphylococcus* sp., más preferentemente, *Staphylococcus aureus*; miembros de la familia *Streptococcaceae*, preferentemente, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi* o *Streptococcus dysgalactiae*; y *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Erysipelothrix* sp., *Listeria* sp., *Micrococcus* sp. y *Mycobacterium* sp., *Kytococcus* sp. y *Erysipelothrix* sp.

La presente divulgación también se dirige al uso de dicho anticuerpo para dirigirse a un microbio que exprese un polipéptido de la presente divulgación o un polipéptido que tenga un epítomo relacionado estructuralmente con un epítomo presente en un polipéptido de la presente divulgación. Un compuesto se puede unir covalentemente a un anticuerpo, pudiendo ser el compuesto, por ejemplo, una toxina. Del mismo modo, dichos compuestos pueden unirse covalentemente a un sideróforo bacteriano para dirigirse al microbio. El acoplamiento químico o la conjugación de un anticuerpo de la presente divulgación, o una parte del mismo (tal como un fragmento Fab), se

pueden llevar a cabo usando métodos conocidos y habituales. En un aspecto, la divulgación también se dirige a tratar una infección en un animal, incluyendo un ser humano, causada por un microbio gram positivo, preferentemente por un miembro de la familia *Micrococcaceae*, preferentemente, *Staphylococcus* sp., más preferentemente, *S. aureus*; miembros de la familia *Streptococcaceae*, preferentemente, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi* o *Streptococcus dysgalactiae*; *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Erysipelothrix* sp., *Kytococcus* sp., *Listeria* sp., *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp. y *Erysipelothrix* sp. Como se usa en el presente documento, el término "infección" se refiere a la presencia de un microbio gram positivo en el organismo de un animal, que puede o no puede ser clínicamente evidente. Un animal con una infección por un miembro del género *Staphylococcus* que no es clínicamente evidente se suele denominar vehículo asintomático. El método incluye la administración de una cantidad eficaz de la composición de la presente invención a un animal que tiene una infección causada por un microbio gram positivo, y determinar si el número de microbios que causan la infección ha disminuido. Los métodos para determinar si una infección está causada por un microbio gram positivo son habituales y conocidos en la técnica, como lo son métodos para determinar si la infección ha disminuido.

En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a métodos para el tratamiento de uno o más síntomas de ciertas afecciones en un animal que pueden estar causadas por la infección por un microbio gram positivo, preferentemente por un miembro de la familia *Micrococcaceae*, preferentemente, *Staphylococcus* sp., más preferentemente, *S. aureus*; miembros de la familia *Streptococcaceae*, preferentemente, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi* o *Streptococcus dysgalactiae*; *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Erysipelothrix* sp., *Kytococcus* sp., *Listeria* sp., *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp. y *Erysipelothrix* sp. El método incluye administrar una cantidad eficaz de una composición de la presente invención a un animal que tiene o está en riesgo de tener una afección o los síntomas de una afección, y determinar si se cambia al menos un síntoma de la afección, preferentemente, se reduce. Los ejemplos de afecciones causadas por las infecciones microbianas incluyen, por ejemplo, mastitis, septicemia, neumonía, meningococcal meningitis, linfangitis, dermatitis, infecciones del tracto genital, paperas, metritis, enfermedad perinatal, abscesos hipofisarios, artritis, bursitis, orquitis, cistitis y pielonefritis, linfadenitis caseosa, tuberculosis, linfangitis ulcerosa, listeriosis, erisipela, laminitis, carbunco, enfermedad de Tyzzer, tétanos, botulismo, enteritis, edema maligno, basquilla, hemoglobinuria bacilar, enterotoxemia, lesiones cutáneas necróticas e infecciones nosocomiales. Los ejemplos de afecciones causadas por *S. aureus* también incluyen, por ejemplo, botriomicosis en caballos, sinovitis purulenta y osteomielitis en aves de corral, abortos en el ganado porcino y piemia por garrapatas en corderos. Los ejemplos de afecciones causadas por *Streptococcus* sp. también incluyen, por ejemplo, dolor de garganta, fiebre escarlatina, impétigo, endocarditis ulcerosa, fiebre reumática y glomerulonefritis cervicitis postestreptocócica en seres humanos, cervicitis equina y porcina, y meningitis y abscesos en la quijada porcinos.

El tratamiento de los síntomas asociados con estas afecciones puede ser profiláctico o, como alternativa, se puede iniciar tras el desarrollo de una afección descrita en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "síntoma" se refiere a pruebas objetivas en un sujeto de una afección causada por la infección por un microbio. Los síntomas asociados con las afecciones mencionadas en el presente documento y las evaluaciones de dichos síntomas son habituales y conocidos en la técnica. El tratamiento que es profiláctico, por ejemplo, que se inicia antes de que un sujeto manifieste los síntomas de una afección causada por un microbio, se denomina en el presente documento el tratamiento de un sujeto que está "en riesgo" de desarrollar la afección. Por lo general, un animal "en riesgo" de desarrollar una afección es un animal presente en una zona en la que se han diagnosticado animales que tienen la afección y/o que es probable que esté expuesto a un microbio causante de la afección. Por consiguiente, la administración de una composición se puede realizar antes, durante o después de la aparición de las afecciones descritas en el presente documento. El tratamiento iniciado tras el desarrollo de una afección puede reducir la gravedad de los síntomas de una de las afecciones, o la eliminación total de los síntomas. En este aspecto de la invención, una "cantidad eficaz" es una cantidad eficaz para prevenir la manifestación de síntomas de una enfermedad, disminuir la gravedad de los síntomas de una enfermedad y/o eliminar por completo los síntomas. El éxito del tratamiento de una infección microbiana gram positiva en un animal se desvela en el Ejemplo 5, que demuestra la protección contra la enfermedad causada por *S. aureus* en modelos de ratones mediante la administración de una composición de la presente invención. Estos modelos de ratón son un modelo comúnmente aceptado para el estudio de la enfermedad humana causada por estos microbios. También se desvela el éxito del tratamiento de una infección microbiana gram positiva en un animal en los Ejemplos 10-12, que demuestran la protección contra la enfermedad causada por *S. aureus* en vacas mediante la administración de una composición de la presente invención.

La presente divulgación también proporciona métodos de reducción de la colonización por microbios gram positivos, por ejemplo, el bloqueo de los sitios de unión del microbio gram positivo, incluyendo tejidos del sistema esquelético (por ejemplo, huesos, cartílagos, tendones y ligamentos), sistema muscular, (por ejemplo, músculos esqueléticos y lisos), sistema circulatorio (por ejemplo, corazón, vasos sanguíneos, capilares y sangre), sistema nervioso (por ejemplo, cerebro, médula espinal y nervios periféricos), sistema respiratorio (por ejemplo, nariz, tráquea, pulmones, bronquios, bronquiolos, alvéolos), sistema digestivo (por ejemplo, boca, glándulas salivales, esófago, hígado, estómago, intestino grueso e intestino delgado), sistema excretor (por ejemplo, riñones, uréteres, vejiga y uretra), sistema endocrino (por ejemplo, hipotálamo, hipófisis, tiroides, páncreas y glándulas suprarrenales), sistema

reproductivo (por ejemplo, ovarios, oviducto, útero, vagina, glándulas mamarias, testículos y las vesículas seminales), sistema linfático/inmunológico (por ejemplo, linfa, ganglios y vasos linfáticos, células mononucleares o glóbulos blancos, tales como macrófagos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, linfocitos T y linfocitos B), y linajes celulares específicos (por ejemplo, células precursoras, células epiteliales, células madre), y similares. Preferentemente, el microbio gram positivo es un miembro de la familia *Micrococcaceae*, preferentemente, *Staphylococcus* sp., más preferentemente, *S. aureus*; un miembro de la familia *Streptococcaceae*, preferentemente, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi* o *Streptococcus dysgalactiae*; *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Erysipelothrix* sp., *Kytococcus* sp., *Listeria* sp., *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp. y *Erysipelothrix* sp. El método incluye administrar una cantidad eficaz de una composición de la presente invención a un animal colonizado por, o en riesgo de ser colonizado por, un microbio gram positivo. En este aspecto de la divulgación, una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para disminuir la colonización del animal por el microbio. Los métodos de evaluación de la colonización de un animal por un microbio son habituales y conocidos en la técnica. Por ejemplo, la colonización del tracto intestinal de un animal por un microbio se puede determinar midiendo la presencia del microbio en las heces del animal. Se espera que la reducción de la colonización de un animal por un microbio reduzca la transmisión del microbio a los seres humanos.

Una composición de la invención se puede usar para proporcionar la inmunización activa o pasiva frente a la infección bacteriana. En general, la composición se puede administrar a un animal para proporcionar la inmunización activa. Sin embargo, la composición también se puede usar para inducir la generación de productos inmunes tales como anticuerpos, que se pueden extraer del animal que los produce y administrarse a otro animal para proporcionar inmunidad pasiva. Se pueden extraer componentes inmunes, tales como anticuerpos, para preparar composiciones (preferentemente que contengan anticuerpos) a partir de suero, plasma, sangre, calostro, etc. para las terapias de inmunización pasiva. También se pueden preparar composiciones de anticuerpos que incluyan anticuerpos monoclonales y/o anti-idiotipos usando métodos conocidos. Los anticuerpos quiméricos incluyen regiones constantes de origen humano de cadenas tanto pesadas como ligeras, y regiones variables de origen murino que son específicas del antígeno (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1984, 81(21):6851-5; LoBuglio *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1989, 86(11): 4220-4; Boulianne *et al.*, *Nature*, 1984, 312(5995): 643-6). Los anticuerpos humanizados sustituyen la región constante y marco (FR) murina (de la región variable) con los homólogos humanos (Jones *et al.*, *Nature*, 1986, 321(6069): 522-5; Riechmann *et al.*, *Nature*, 1988, 332(6162): 323-7; Verhoeyen *et al.*, *Science*, 1988, 239(4847): 1534-6; Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1989, 86(24):10029-33; Daugherty *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19(9): 2471-6). Como alternativa, se pueden usar ciertas cepas de ratón que han sido diseñadas genéticamente para producir anticuerpos que son casi completamente de origen humano; tras la inmunización, se recogen los linfocitos B de estos ratones y se inmortalizan para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Bruggeman y Taussig, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1997, 8(4): 455-8; Lonberg y Huszar, *Int. Rev. Immunol.*, 1995; 13(1): 65-93; Lonberg *et al.*, *Nature*, 1994, 368: 856-9; Taylor *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20:6287-95). Las composiciones de anticuerpos y los fragmentos de las mismas, por ejemplo, scFv, Fab, F(ab')₂ o Fv u otras formas modificadas de los mismos, se pueden administrar a un receptor en forma de suero, plasma, sangre, calostro y similares. Sin embargo, los anticuerpos también pueden aislarse del suero, plasma, sangre, calostro, y similares, usando métodos conocidos para su uso posterior en una forma concentrada o reconstituida, tal como, por ejemplo, soluciones de lavado, apósitos impregnados y/o agentes tópicos, y similares. Los preparados de inmunización pasiva pueden ser particularmente ventajosos para el tratamiento de la enfermedad sistémica aguda o la inmunización pasiva de animales jóvenes que no hayan recibido los niveles adecuados de inmunidad pasiva a través del calostro materno. Los anticuerpos útiles para la inmunización pasiva también pueden ser útiles para conjugarse con diversos fármacos o antibióticos que se podrían dirigir directamente a las bacterias que expresan durante una infección sistémica o localizada un polipéptido de la presente divulgación o un polipéptido que tenga un epítipo relacionado estructuralmente con un epítipo presente en un polipéptido de la presente divulgación.

Se dispone de modelos animales, en particular, de modelos de ratón, para evaluar experimentalmente las composiciones de la presente invención. Estos modelos de ratón son modelos comúnmente aceptados para el estudio de las enfermedades humanas causadas por miembros del género *Staphylococcus* y *S. aureus* en particular. En aquellos casos en los que los miembros del género *Staphylococcus* causan la enfermedad en un animal, por ejemplo, en una vaca, el huésped natural se puede usar para evaluar experimentalmente las composiciones de la presente invención.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona métodos de detección del anticuerpo que se une específicamente a los polipéptidos de la presente divulgación. Estos métodos son útiles, por ejemplo, en detectar si un animal tiene anticuerpo que se une específicamente a los polipéptidos de la presente divulgación, y diagnosticar si un animal puede tener una afección causada por un microbio que exprese los polipéptidos descritos en el presente documento o que exprese polipéptidos que comparten epítopos con los polipéptidos descritos en el presente documento. Dichos sistemas de diagnóstico pueden estar en forma de kit. Los métodos incluyen poner en contacto un anticuerpo con un preparado que incluye un polipéptido de la presente divulgación para producir una mezcla. El anticuerpo puede estar presente en una muestra biológica, por ejemplo, sangre, leche o calostro. El método incluye además la incubación de la mezcla en condiciones que permitan que el anticuerpo se una específicamente al polipéptido para formar un complejo de polipéptido:anticuerpo. Como se usa en el presente

documento, la expresión complejo de polipéptido:anticuerpo se refiere al complejo que se produce cuando un anticuerpo se une específicamente a un polipéptido. El preparado que incluye los polipéptidos de la presente divulgación puede incluir también reactivos, por ejemplo, un tampón, que proporcionen las condiciones adecuadas para la formación del complejo de polipéptido:anticuerpo. A continuación, se detecta el complejo de polipéptido:anticuerpo. La detección de anticuerpos es conocida en la técnica, y puede incluir, por ejemplo, inmunofluorescencia o peroxidasa. Los métodos de detección de la presencia de anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de la presente divulgación se pueden usar en diversos formatos que se han usado para detectar anticuerpos, incluyendo el radioinmunoensayo y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

La presente divulgación también proporciona un kit para la detección de anticuerpo que se une específicamente a los polipéptidos de la presente divulgación. El anticuerpo detectado se puede obtener de un animal sospechoso de tener una infección causada por un microbio gram positivo, más preferentemente, un miembro de la familia *Micrococcaceae*, preferentemente, *Staphylococcus* sp., más preferentemente, *S. aureus*; *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Corynebacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Erysipelothrix* sp., *Kytococcus* sp., *Listeria* sp., *Micrococcus* sp., *Mycobacterium* sp. y *Erysipelothrix* sp.

El kit incluye al menos uno de los polipéptidos de la presente divulgación o un número de polipéptidos que sea un número entero superior a 1 (por ejemplo, al menos 2, al menos 3, etc.), en un material de envasado adecuado en una cantidad suficiente para al menos un ensayo. Opcionalmente, también se incluyen otros reactivos tales como tampones y soluciones necesarios para la práctica de la divulgación. Por ejemplo, un kit puede incluir también un reactivo que permita la detección de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de la presente divulgación, tal como un anticuerpo secundario marcado de forma detectable diseñado para unirse específicamente a un anticuerpo obtenido de un animal. Normalmente, también se incluyen instrucciones de uso de los polipéptidos envasados. Como se usa en el presente documento, la expresión "material de envasado" se refiere a una o más estructuras físicas usadas para albergar el contenido del kit. El material de envasado se construye mediante métodos bien conocidos, en general, para proporcionar un ambiente estéril, exento de contaminantes. El material de envasado puede tener una etiqueta que indique que los polipéptidos se pueden usar para la detección de anticuerpo que se une específicamente a los polipéptidos de la presente divulgación. Además, el material de envasado contiene instrucciones que indican cómo se emplean los materiales del kit para detectar el anticuerpo. Como se usa en el presente documento, el término "envase" se refiere a un recipiente, tal como de vidrio, plástico, papel, papel de aluminio, y similares, capaz de contener dentro de límites fijos los polipéptidos y otros reactivos, por ejemplo, un anticuerpo secundario. Así pues, por ejemplo, un envase puede ser un pocillo de una placa de microvaloración en el que se hayan fijado cantidades en microgramos de polipéptidos. Un envase también puede contener un anticuerpo secundario. Las "instrucciones de uso" normalmente incluyen una expresión tangible que describe la concentración de reactivo o al menos un parámetro del método de ensayo, tal como las cantidades relativas de reactivo y de muestra que se han de mezclar, los períodos de tiempo de mantenimiento para las mezclas de reactivo/muestra, la temperatura, las condiciones de tampón, y similares.

Ejemplos

En la medida en que los ejemplos no se refieren a la composición definida en las reivindicaciones, se incluyen en el presente documento meramente a efectos de referencia.

Ejemplo 1

Preparación de las proteínas reguladas por el hierro

Escala de laboratorio

Se evaluaron composiciones derivadas de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* incluyendo nuevas proteínas expresadas bajo restricción de hierro y/u otros grados de quelación de iones metálicos para determinar la eficacia contra un desafío virulento en ratones. La eficacia de la composición se evaluó mediante la recopilación de datos sobre los siguientes parámetros: (1) la eficacia de cada composición para proporcionar protección homóloga y heteróloga contra un desafío virulento vivo en ratones; (2) la eficacia de cada composición para reducir las lesiones cutáneas necróticas; y (3) la eficacia de las composiciones derivadas de *Staphylococcus* cultivadas en condiciones de saturación y de empobrecimiento de hierro para proporcionar protección.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* evaluadas en este estudio procedían de tres especies de animales; aviar, humana y bovina. El aislado SAAV1 aviar era un aislado de campo procedente de una multitud de pavos enfermos que tenían un alto grado de osteomielitis y sinovitis. Los aislados bovinos (cepa 1477 y cepa 2176) se obtuvieron de dos grupos lecheros comerciales diferentes que tenían una alta incidencia de mastitis clínica. El aislado humano se obtuvo de la ATCC (cepa 19636), y procedía de un paciente que tenía osteomielitis clínica.

Se prepararon reservas de semillas maestras de cada aislado mediante la inoculación del aislado apropiado en 200 ml de caldo de soja triptico (TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI) que contenía 2,2-dipiridilo 300 µM (Sigma-Aldrich St. Louis, MO). El cultivo se desarrolló mientras se agitaba a 200 rpm durante 6 horas a 37 °C, y se recogió

por centrifugación a 10.000 x g. Se volvió a suspender el sedimento bacteriano en 100 ml de caldo TSB que contenía glicerol al 20 %, y se dispensó de forma estéril en viales criogénicos de 2 ml (1 ml por vial) y se almacenó a -90 °C hasta su uso.

5 Se expandió cada reserva de semillas maestras en una semilla de trabajo. Se inoculó un vial de cada aislado de semilla maestra en 200 ml de caldo de soja triptico (TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI) que contenía 2,2-dipiridilo 1.000 µM (Sigma-Aldrich St. Louis, MO). El cultivo se desarrolló mientras se agitaba a 200 rpm durante 6 horas a 37 °C, y se recogió por centrifugación a 10.000 x g. Se resuspendió el sedimento bacteriano en 100 ml de caldo TSB que contenía glicerol al 20 %, y se dispensó de forma estéril en viales criogénicos de 2 ml (1 ml por vial) y se
10 almacenó a -90 °C hasta su uso. La semilla de trabajo se usó para la producción de composiciones enriquecidas con proteínas de membrana reguladas por el nivel de hierro, que incluían proteínas de membrana reguladas por el nivel de hierro.

15 Todas las cepas estaban adaptadas para crecer en medios altamente empobrecidos en hierro (es decir, medios que contenían niveles muy bajos de hierro libre). Esto se realizó mediante el subcultivo de las bacterias en TSB que contenía concentraciones crecientes de 2,2-dipiridilo (300-1.600 µM).

Se prepararon proteínas a partir de las bacterias de la siguiente manera. Se cultivaron las bacterias a partir de las reservas de semillas de trabajo congeladas mediante el subcultivo en 25 ml de medios empobrecidos en hierro (que contenían 2,2'-dipiridilo 1.000 µM) y medios saturados de hierro, y luego se incubaron a 37 °C con agitación a 400 rpm. Tras 12 horas de incubación, se transfirieron 5 ml de cada cultivo a 500 ml de medios empobrecidos en hierro o medios saturados de hierro previamente incubados a 37 °C. Se incubaron los cultivos durante 8 horas a 37 °C con agitación a 100 rpm, y luego se sedimentaron las células mediante centrifugación a 10.000 x g durante 20 minutos. Se volvieron a suspender los sedimentos bacterianos en 100 ml de solución salina fisiológica estéril y se
20 centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos. Luego, se volvieron a suspender los sedimentos en 45 ml de solución salina tamponada con Tris, pH 7,2 (TBS; Tris 25 mM, NaCl 150 mM) y se dispensaron las suspensiones bacterianas resultantes en forma de alícuotas de 9 ml en 5 tubos individuales. Se añadió un mililitro de TBS que contenía 50 unidades de lisostafina (Sigma, St. Louis, MO) a cada tubo para dar un volumen final de 5 unidades/ml. Tras la incubación a 37 °C durante 30 minutos con agitación a 200 rpm, se añadió 1 ml de TBS que contenía 0,1 mg de lisozima (Sigma) a cada tubo. A continuación, se incubaron las suspensiones bacterianas durante otros 45 minutos con agitación a 200 rpm. A continuación, se centrifugaron las suspensiones a 3.050 x g durante 12 minutos a 4 °C para sedimentar los residuos celulares de gran tamaño. Se recogieron los sobrenadantes mediante aspiración sin perturbar el sedimento. Se centrifugó el sobrenadante a 39.000 x g durante 2,5 horas. Se volvieron a suspender los sedimentos resultantes que contenían las proteínas en 200 µl de tampón Tris, pH 7,2, sin solución salina. Se
25 combinaron la solución de proteínas para cada aislado para un volumen total de 1 ml y se almacenaron a -90 °C.

Se fraccionaron de tamaño los extractos enriquecidos en proteínas derivados de *S. aureus* en geles de SDS-PAGE usando un gel de apilamiento al 4 % y gel de resolución al 10 %. Se prepararon las muestras para la electroforesis combinando 10 µl de muestra con 30 µl de tampón reductor de muestra SDS (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, glicerol al 20 %, SDS al 2 %, β-mercaptoetanol al 5 %) y se hirvieron durante 4 minutos. Se sometieron las muestras a electroforesis a corriente constante de 18 mA durante 5 horas a 4 °C usando una fuente de alimentación de células Protein II xi (BioRad Laboratories, Richmond, CA, modelo 1000/500). Se estimó el peso molecular de cada proteína individual observada visualmente en el gel de SDS-PAGE usando un densitómetro GS-800 (BioRad) usando un
30 marcador del peso molecular de intervalo amplio como patrón de referencia (BioRad).

45 Al cultivar los patrones de SDS-PAGE de las proteínas de cada aislado en presencia de dipiridilo 1.600 µM mostraron un patrón de expresión de la proteína muy diferente en comparación con la misma cepa cultivada en presencia de dipiridilo 300 µM. Por ejemplo, cuando se cultivó en dipiridilo 300 µM, el aislado de SAAV1 dio lugar a proteínas reguladas por el nivel de metal de 90 kDa, 84 kDa, 72 kDa, 66 kDa, 36 kDa, 32 kDa y 22 kDa, mientras que el cultivo en dipiridilo 1600 µM dio lugar a proteínas reguladas por el nivel de metal de 87,73 kDa, 54,53 kDa, 38,42 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa y 33,0 kDa. Del mismo modo, cuando se cultivó en dipiridilo 300 µM, el aislado 19636 dio lugar a proteínas de 42 kDa y 36 kDa, mientras que el crecimiento en dipiridilo 1.600 µM dio lugar a proteínas reguladas por el nivel de metal de 87,73 kDa, 54,53 kDa, 38,42 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa y 33,0 kDa. Todas las condiciones, incluyendo el crecimiento en medios saturados de hierro, dieron como resultado la expresión de las siguientes proteínas que, presumiblemente, no estaban reguladas por el nivel de metal: 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa y 40 kDa.

Además, el crecimiento de las diferentes cepas de *S. aureus* en dipiridilo 1.600 µM dio como resultado patrones de expresión de proteínas similares. Las composiciones enriquecidas en proteínas de membrana reguladas por el nivel de hierro del aislado aviar (SAAV1) incluían proteínas con pesos moleculares de 87,73 kDa, 54,53 kDa, 38,42 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa y 33,0 kDa. Los pesos moleculares de las proteínas del aislado ATCC 19636 resultaron ser esencialmente idénticos a los del aislado aviar. Ambos aislados bovinos, cuando se cultivaron con 2,2-dipiridilo 1.600 µM, expresaron perfiles de bandas similares a los de los aislados aviar y ATCC para la mayoría de las proteínas (87,73 kDa, 54,53 kDa, 37,7 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa y 33,0 kDa). Sin embargo, ninguno de los aislados bovinos produjo la proteína de 38,42 kDa observada con los aislados aviar y ATCC, y los aislados bovinos expresaron tres proteínas (80,46 kDa, 65,08 kDa y 31,83 kDa) no observadas con las cepas aviar y ATCC (véase la
60 65

Figura 1 y la Tabla 10). Todas las condiciones dieron como resultado la expresión de las siguientes proteínas que no estaban reguladas por el nivel de metal: 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa y 40 kDa.

5 Tabla 10. Pesos moleculares de los polipéptidos regulados por el nivel de metal obtenidos de aislados de *Staphylococcus aureus*

SAAV1 aviar	19636 humana	1477 bovina	2176 bovina
87,73	87,73	87,73	87,73
-	-	80,46	80,46
-	-	65,08	65,08
54,53	54,53	54,53	54,53
38,42	38,42	-	-
37,37	37,37	37,37	37,37
35,70	35,70	35,70	35,70
34,91	34,91	34,91	34,91
33,0	33,0	33,0	33,0
		31,83	31,83

Curiosamente, no hubo diferencia en los perfiles de proteínas examinados por SDS-PAGE entre el sobrenadante aclarado y el sedimento bacteriano tras tratar las bacterias con lisostafina/lisozima. Tanto el sedimento bacteriano extraído como el sobrenadante resultaron tener exactamente los mismos perfiles de proteínas examinados mediante SDS-PAGE. Esta misma observación también se observó al alterar las células bacterianas usando un homogeneizador Avestin a 206.842,72 kPa (30.000 psi). El sedimento bacteriano resultante, tras la centrifugación a baja velocidad, resultó tener un perfil de proteínas idéntico al del sobrenadante aclarado tras la centrifugación a alta velocidad a 30.000 x g durante 2,0 horas a 4 °C.

15 Ejemplo 2

Preparación de las composiciones inmunizantes derivadas de *Staphylococcus aureus*

20 Se usaron las proteínas del aislado ATCC humana 19636 y del aislado bovino 1477, cultivadas en condiciones de empobrecimiento de hierro y preparadas como se describe en el Ejemplo 1, para formular dos composiciones de vacuna. Las proteínas del aislado ATCC tenían pesos moleculares de 87,73 kDa, 54,53 kDa, 38,42 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa y 33,0 kDa, mientras que el aislado bovino expresó proteínas que tenían pesos moleculares de 87,73 kDa, 80,46 kDa, 65,08 kDa, 54,53 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa, 33,0 kDa y 31,83. Cada composición también contenía las siguientes proteínas que no estaban reguladas por el nivel de metal: 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa y 40 kDa. Se prepararon vacunas de reserva a partir de las dos cepas mediante la emulsión de cada suspensión acuosa de proteínas (500 µg de proteína total/ml) en un adyuvante comercial (EMULSIGEN, MVP Laboratories, Ralston, Nebraska) usando un recipiente de homogenización IKA Ultra Turrax T-50 (IKA, Cincinnati, OH), dando una dosis final de 50 µg de proteína total en un volumen inyectable 0,1 ml con una concentración de adyuvante del 22,5 % vol/vol. Como vacuna de control, se preparó una composición de proteína a partir del aislado bovino 1,477 cultivado en condiciones de saturación de hierro (TSB suplementado con cloruro férrico 300 µM) como se describe en el Ejemplo 1. Se preparó una vacuna de placebo sustituyendo la solución salina fisiológica por la suspensión acuosa de proteínas en el protocolo anterior.

35 Ejemplo 3

Vacunación de ratones

40 Se distribuyeron en partes iguales setenta (N = 70) ratones hembra CF-1 obtenidos en Harlan Breeding Laboratories (Indianápolis, IN) con un peso de 16-22 gramos en 7 grupos (10 ratones/grupo). Los animales fueron alojados en jaulas de policarbonato para ratones (Ancore Corporation, Bellmore, NY). Se usó una sola jaula por cada grupo de tratamiento, y se suministraron comida y el agua a voluntad a todos los ratones. Todos los ratones fueron vacunados por vía intraperitoneal con 0,1 ml de la composición apropiada dos veces en intervalos de 14 días de la siguiente manera:

- 45
- Grupo 1: vacunado con placebo.
 - Grupo 2: vacunado con proteínas de ATCC 19636 expresadas en condiciones de restricción de hierro.

Grupo 3: vacunado con placebo.

Grupo 4: vacunado con proteínas 1477 bovinas expresadas en condiciones de restricción de hierro.

Grupo 5: vacunado con proteínas 1477 bovinas expresadas en condiciones de restricción de hierro.

Grupo 6: vacunado con proteínas ATCC 19636 expresadas en condiciones de restricción de hierro.

5 Grupo 7: vacunado con 1477 bovino con FeCl_3 , en el que "1477 bovino con FeCl_3 " se refiere a proteínas obtenidas de 1477 bovino cultivado en TSB suplementado con cloruro férrico 300 μM .

Ejemplo 4

10 Preparación del organismo de desafío

Se usaron las cepas ATCC 19636 y la cepa 1477 de *Staphylococcus aureus* descritas anteriormente como organismos de desafío. En resumen, se sembraron en estrías los aislados procedentes de las reservas congeladas (descritas anteriormente) en placas de agar de sangre y se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Se subcultivó una sola colonia de cada aislado en 50 ml de caldo de soja triptico (Difco) que contenía 2,2'-dipiridilo 1.600 μM . Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 6 horas mientras se centrifugaban a 200 rpm, luego se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar las bacterias. Se lavaron los sedimentos bacterianos dos veces mediante centrifugación en TBS a 4 °C. Se volvieron a suspender los sedimentos finales en TBS a una densidad óptica del 42 % de transmitancia (T) a 562 nm en un volumen de aproximadamente 25 ml de TBS y se usaron para el desafío. Justo antes del desafío, se diluyó en serie 1 ml de estas suspensiones bacterianas y se sembró en agar para enumerar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por dosis de ratón.

Ejemplo 5

25 Desafío

Catorce días después de la segunda vacunación, se desafiaron subcutáneamente los ratones de todos los grupos (1-7) en la parte posterior del cuello con 0,1 ml del organismo apropiado. Los siete grupos de ratones se desafiaron de la siguiente manera:

30 Grupo 1: (vacunado con placebo): desafiado con ATCC 19636.
 Grupo 2: (vacunado con proteínas de ATCC 19636 expresadas en condiciones de restricción de hierro): desafiado con ATCC 19636.
 Grupo 3: (vacunado con placebo): desafiado con 1477 bovino.
 35 Grupo 4: (vacunado con proteínas 1477 bovinas expresadas en condiciones de restricción de hierro): desafiado con 1477 bovino.
 Grupo 5: (vacunado con proteínas 1477 bovinas expresadas en condiciones de restricción de hierro): desafiado con ATCC 19636.
 Grupo 6: (vacunado con proteínas ATCC 19636 expresadas en condiciones de restricción de hierro): desafiado con 1477 bovino.
 40 Grupo 7: (vacunado con 1477 bovino con FeCl_3): desafiado con 1477 bovino.

Como se determinó mediante el protocolo de enumeración descrito en el Ejemplo 4, la concentración de 19636 de *S. aureus* usada para el desafío fue de $1,35 \times 10^8$ UFC por dosis de ratón, y la concentración de 1477 de *S. aureus* usada para el desafío fue de $1,65 \times 10^8$ UFC por dosis de ratón. Se registraron la morbilidad, la mortalidad y la patología macroscópica diariamente durante 7 días tras el desafío.

Al comparar los ratones desafiados con el aislado ATCC 19636, el 70 % de los ratones del Grupo 1 vacunado con placebo murió en los 7 días de desafío (Tabla 11 y la Fig. 2). Esto demostró que la cepa 19636 causó una alta tasa de mortalidad en los ratones a la dosis administrada. En contraste con los ratones del Grupo 1, solo el 10 % de los ratones del Grupo 2 murió en los 7 días posteriores al desafío. Estos resultados ilustraban que los ratones desafiados con la cepa 19636 fueron protegidos de manera significativa por la vacunación con la composición 19636 ($p = 0,020$, prueba exacta de Fischer). Además, un análisis de Kaplan-Meier de los datos del tiempo transcurrido hasta la muerte indicó que la vacuna proporcionó protección significativa ($p = 0,0042$, prueba de rango logarítmico) contra el desafío homólogo (Fig. 3). Además, solo el 20 % de los ratones del Grupo 5 murió en los 7 días de desafío, lo que indica que la composición 1477 bovina ofreció una protección significativa contra el desafío con la cepa ATCC 19636 ($p = 0,015$, prueba de rango logarítmico para la mortalidad). Cuando se analizaron los datos mediante una curva de supervivencia de Kaplan-Meier y la prueba de rango logarítmico (Fig. 4), se determinó que la protección contra la mortalidad resultó ser significativa ($p = 0,015$, prueba de rango logarítmico para la mortalidad), lo que indica que la composición de vacuna derivada de la cepa 1477 proporcionó protección heteróloga contra el desafío con la cepa 19636.

Tabla 11. Mortalidad de los ratones vacunados y no vacunados tras el desafío con *Staphylococcus aureus* (aislado ATCC 19636 humano y aislado 1477 bovino).

Grupos	N.º de ratones	N.º de muertes	Porcentaje de mortalidad (%)
Grupo 1* (Placebo, desafío con ATCC 19636)	10	7/10	70
Grupo 2* (ATCC 19636, desafío homólogo)	10	1/10	10
Grupo 3 (Placebo, desafío con 1477 bovino)	10	2/10	20
Grupo 4* (1477 bovino, desafío homólogo)	10	1/10	10
Grupo 5* (1477 bovino, desafío heterólogo)	10	2/10	20
Grupo 6* (ATCC 19636, desafío heterólogo)	10	0/10	0
Grupo 7* (1477 bovino con FeCl ₃ , desafío con 1477 bovino)	10	2/10	20
*Grupo 1: (vacunado con placebo/desafiado con ATCC 19636) *Grupo 2: (vacunado con proteínas de ATCC 19636 expresadas en condiciones de restricción de hierro/desafiado con ATCC 19636) *Grupo 3: (vacunado con placebo/desafiado con 1477 bovino) *Grupo 4: (vacunado con proteínas 1477 bovinas expresadas en condiciones de restricción de hierro/desafiado con 1477 bovino) *Grupo 5: (vacunado con proteínas 1477 bovinas expresadas en condiciones de restricción de hierro/desafiado con ATCC 19636) *Grupo 6: (vacunado con proteínas ATCC 19636 expresadas en condiciones de restricción de hierro/desafiado con 1477 bovino) *Grupo 7: (vacunado con 1477 bovino con FeCl ₃ /desafiado con 1477 bovino)			

5 Al comparar los ratones inoculados con el aislado 1477 bovino, solo el 20 % de los ratones del grupo vacunado con
 10 placebo (Grupo 3) murió en los 7 días de desafío. Sin embargo, el desafío con el aislado 1477 bovino provocó el
 15 desarrollo de lesiones cutáneas necróticas en 6 (75 %) de los ratones supervivientes del Grupo 3. Se midieron estas
 20 lesiones, y el tamaño medio de las lesiones en los ratones que sobrevivieron fue de 18,5 mm (Tabla 12). Por el
 25 contrario, el 20 % de los ratones del Grupo 4 murió en los 7 días de desafío, pero solo tres (38 %) de los ratones
 supervivientes desarrollaron lesiones (diámetro medio de 2,7 mm). Estos resultados indican que la composición de
 1477 bovino ofreció protección homóloga significativa contra el desarrollo de lesiones en los ratones desafiados con
 la cepa bovina 1477 ($p = 0,009$, prueba t de Student). Además, la vacunación con la composición de ATCC 19636
 protegió contra el desafío con la cepa 1477, ya que ningún ratón del Grupo 6 murió y solo tres (30 %) de los ratones
 desarrollaron lesiones cutáneas (diámetro medio de 3,7 mm). En conjunto, la reducción de la mortalidad y/o del
 desarrollo de lesiones en los ratones de los Grupos 5 y 6 demuestra la importante naturaleza protectora cruzada de
 las composiciones derivadas de las cepas 19636 y 1477 ($p = 0,012$, prueba t de Student basada en el tamaño de las
 lesiones). En demostración de la eficacia de la composición en comparación con las proteínas no reguladas por el
 nivel de hierro, el 20 % de los ratones del Grupo 7 murió y 4 de los sobrevivientes desarrollaron lesiones cutáneas
 (diámetro medio de 15,8 mm). Los ratones del Grupo 7 demostraron cierto grado de protección mediante la
 vacunación con las proteínas del aislado 1477, ya que menos ratones desarrollaron lesiones en comparación con el
 Grupo 3 vacunado con placebo. Sin embargo, las lesiones cutáneas observadas en los ratones del Grupo 7 fueron
 más frecuentes y de un diámetro mayor que las lesiones de los ratones del Grupo 4, lo que indica que, en relación
 con las proteínas aisladas de células cultivadas en condiciones de saturación de hierro, las proteínas aisladas de
 bacterias cultivadas en condiciones de restricción de hierro ofrecieron una protección superior contra un desafío
 idéntico.

Tabla 12. Inducción de lesiones necróticas en ratones siete días después del desafío con *Staphylococcus aureus* (aislado ATCC 19636 y/o aislado 1477 bovino)

Diámetro de las lesiones (milímetros) por ratón						
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
Sin lesiones	Sin lesiones	26	5	5	5	25
Sin lesiones	Sin lesiones	25	2	Sin lesiones	5	25

Diámetro de las lesiones (milímetros) por ratón						
Sin lesiones	Sin lesiones	24	1	Sin lesiones	1	10
Muerto	Sin lesiones	24	Sin lesiones	Sin lesiones	Sin lesiones	3
Muerto	Sin lesiones	7	Sin lesiones	Sin lesiones	Sin lesiones	Sin lesiones
Muerto	Sin lesiones	5	Sin lesiones	Sin lesiones	Sin lesiones	Sin lesiones
Muerto	Sin lesiones	Sin lesiones	Sin lesiones	Sin lesiones	Sin lesiones	Sin lesiones
Muerto	Sin lesiones	Sin lesiones	Sin lesiones	Sin lesiones	Sin lesiones	Sin lesiones
Muerto	Sin lesiones	Muerto	Sin lesiones	Muerto	Sin lesiones	Muerto
Muerto	Muerto	Muerto	Muerto	Muerto	Sin lesiones	Muerto
Diámetro medio de las lesiones (mm) entre los ratones supervivientes						
0	0	18,5	2,7	5	3,7	15,8
*Grupo 1: (vacunado con placebo/desafiado con ATCC 19636)						
*Grupo 2: (vacunado con proteínas de ATCC 19636 expresadas en condiciones de restricción de hierro/desafiado con ATCC 19636)						
*Grupo 3: (vacunado con placebo/desafiado con 1477 bovino)						
*Grupo 4: (vacunado con proteínas 1477 bovinas expresadas en condiciones de restricción de hierro/desafiado con 1477 bovino)						
*Grupo 5: (vacunado con proteínas 1477 bovinas expresadas en condiciones de restricción de hierro/desafiado con ATCC 19636)						
*Grupo 6: (vacunado con proteínas ATCC 19636 expresadas en condiciones de restricción de hierro/desafiado con 1477 bovino)						
*Grupo 7: (vacunado con 1477 bovino con FeCl ₃ /desafiado con 1477 bovino)						

La naturaleza de protección cruzada de las proteínas observadas en el estudio de desafío de los ratones se apoya en los pesos moleculares similares de las proteínas de las cepas de *S. aureus* que se describen en el Ejemplo 1 (Figura 1). Aunque no hubo diferencias apreciables en el perfil de SDS-PAGE de las proteínas de los aislados de origen bovino, en concreto, la ausencia de una proteína de 38,4 kDa y la presencia de 3 proteínas adicionales, las proteínas de las dos cepas 1477 y de ATCC 19636 generaron protección heteróloga. Estos resultados indican que las proteínas similares entre las cepas 19636 y 1477 probablemente son responsables de la protección cruzada observada en los Grupos 5 y 6. Por el contrario, los perfiles de proteínas de la cepa 1477 cultivada en condiciones de empobrecimiento de hierro y de saturación de hierro son diferentes. Esas proteínas aisladas en condiciones de empobrecimiento de hierro son más protectoras que las proteínas aisladas en condiciones de saturación de hierro, demostrado por la reducción del desarrollo de lesiones entre los ratones del Grupo 4 en comparación con los ratones del Grupo 7.

Ejemplo 6

En los mamíferos, se ha demostrado que la respuesta a la lesión tisular o la infección bacteriana produce una respuesta inflamatoria aguda. Esta respuesta aumenta la permeabilidad capilar y la infiltración fagocítica que da lugar a signos clínicos reconocidos como inflamación; hinchazón, fiebre, dolor y enrojecimiento, que, si no se controlan, pueden conducir a la muerte. La activación de factores humorales y la liberación de citocinas median acontecimientos sistémicos conocidos colectivamente como la respuesta de proteínas de fase aguda que genera una cascada de acontecimientos fisiológicos y bioquímicos. La duración de esta respuesta está directamente relacionada con la gravedad de la lesión y la magnitud de la infección sistémica. Se ha documentado bien que, durante la sepsis bacteriana, la cirugía mayor, las quemaduras y otros traumatismos corporales, se produce una alteración en la concentración de una serie de iones metálicos en suero tales como hierro, cobre y cinc. Por ejemplo, durante la fase aguda de una infección, se produce una reducción de los niveles plasmáticos de hierro y cinc, y un aumento del cobre. La alteración de estos iones metálicos en suero puede afectar directamente a la gravedad o a la progresión de cualquier infección bacteriana.

En este estudio, se examinó la expresión de proteínas de *Staphylococcus aureus* en diversas condiciones de restricción de iones metálicos para imitar la expresión de nuevas proteínas que pueden expresarse durante la invasión sistémica. Las cepas de *Staphylococcus aureus* evaluadas en este estudio procedían de muestras clínicas de tres especies diferentes de animales; aviar (cepa SAAV1), humana (cepa 19636) y bovinas (cepas 1477 y 2176). En resumen, se prepararon cultivos de cada aislado de las reservas de semillas maestras en 200 ml de caldo de soja triptico (TSB). Se dejó crecer cada cultivo mientras se agitaba a 200 rpm durante 6 horas a 37 °C. Se transfirieron diez ml de cada cultivo a 500 ml de TSB empobrecido que contenía uno de los cuatro quelantes de iones metálicos; 2,2-dipiridilo (DP), 2-piridilmetil-etilendiamina (TPEN), catequina y naringenina (todos obtenidos de

Sigma, St. Louis, MO). Además cada cultivo también se cultivó en medios saturados en cationes que contenían cloruro férrico, cloruro de cinc y/o cloruro de cobre preparados a concentraciones de 300 μM . Los quelantes de iones metálicos se usaron a la siguiente concentración: el 2,2-dipiridilo (800 μM), la catequina y la naringenina se usaron a 300 μM , y la 2-piridilmetil-etilendiamina se usó a una concentración de 100 μM . Los cultivos se cultivaron con cada quelante durante 8 horas, momento en el que el cultivo se subcultivó una segunda vez durante 12 horas más. Se subcultivó cada cultivo durante tres pasadas consecutivas a intervalos de 12 horas. Al final de la tercera pasada, cada cultivo se recogió mediante centrifugación a 10.000 x g durante 20 minutos. Se lavó cada cultivo dos veces mediante centrifugación a 10.000 x g y se volvió a suspender en 20 ml de solución salina tamponada con Tris, pH 7,2 a 4 °C.

Se volvió a suspender cada sedimento bacteriano en 45 ml de solución salina tamponada con Tris, pH 7,2 (Tris 25 mM y NaCl 150 mM) y se dispensaron las suspensiones bacterianas resultantes como alícuotas de 9 ml en 5 tubos individuales, veinte tubos en total. Se añadió un mililitro de TBS que contenía 50 unidades de lisostafina (Sigma, St. Louis, MO) a cada tubo para dar una concentración final de 5 unidades/ml. Tras la incubación a 37 °C durante 30 minutos con agitación a 200 rpm, se añadió 1 ml de TBS que contenía 0,1 mg de lisozima (Sigma) a cada tubo. A continuación, se incubaron las suspensiones bacterianas durante 45 minutos con agitación a 200 rpm. Después, se centrifugaron las suspensiones a 3.050 x g durante 12 minutos a 4 °C para sedimentar los restos celulares de gran tamaño. Se recogieron los sobrenadantes por aspiración sin perturbar el sedimento. Luego se centrifugó el sobrenadante a 39.000 x g durante 2,5 horas. Se volvieron a suspender los sedimentos resultantes, enriquecidos en proteínas de membrana reguladas por el nivel de metal, en 200 μl de tampón de Tris, pH 7,2. Se combinaron las soluciones de proteína para cada aislado para un volumen total de 1 ml y se almacenaron a -90 °C.

Las proteínas obtenidas de los aislados SAAV1, 19636, 1477 y 2176 de *S. aureus* cultivadas en condiciones de empobrecimiento de hierro, cinc y cobre incluían polipéptidos regulados por el nivel de metal.

Los extractos celulares, derivados de cada aislado se fraccionaron de tamaño en geles de SDS-PAGE usando un gel de apilamiento al 4 % y gel de resolución al 10 %. Se prepararon las muestras para la electroforesis combinando 10 μl de muestra con 30 μl de tampón reductor de muestra SDS (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, glicerol al 20 %, SDS al 2 %, mercaptoetanol al 5 %) y se hirvieron durante 4 minutos. Se sometieron las muestras a electroforesis a corriente constante de 18 mA durante 5 horas a 4 °C usando una fuente de alimentación de células Protein II xi (BioRad Laboratories, Richmond, CA, modelo 1000/500).

Los patrones de SDS-PAGE de las proteínas cultivadas en quelación de cinc y/o de cobre mostraron patrones de bandas únicos en todos los aislados que eran diferentes en comparación con los mismos aislados cultivados en condiciones de restricción de hierro en presencia de 2,2'-dipiridilo. Por ejemplo, cuando se cultivó el aislado 19636 en condiciones de restricción de hierro o en presencia del quelante de 2,2'-dipiridilo, se expresaron proteínas únicas reguladas por el nivel de hierro en las regiones de 87,73 kDa, 54,53 kDa, 38,42 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa y 33,0 kDa. Estas proteínas se regularon por reducción cuando el aislado se cultivó en presencia de cloruro férrico. Sin embargo, cuando el mismo aislado se cultivó en presencia de quelante de cinc y de cobre, se expresaron nuevos subconjuntos de proteínas con respecto a las proteínas expresadas en condiciones de restricción de hierro; nuevas proteínas que tenían pesos moleculares de aproximadamente 115 kDa, 88 kDa, 80 kDa, 71 kDa, 69 kDa, 35 kDa, 30 kDa, 29 kDa y 27 kDa. Además, se expresó una proteína de 87,73 kDa en condiciones de restricción de hierro o de restricción de cobre, pero no en condiciones de restricción de cinc. Las proteínas expresadas en condiciones de restricción de hierro parecieron regularse por reducción cuando el crecimiento se produjo en condiciones bien de restricción de hierro y/o de restricción de cobre, pero no se inactivaron por completo según lo observado al cultivar el aislado en cloruro férrico.

Parece que se expresan nuevas proteínas cuando el organismo se cultiva en condiciones de restricción de cobre y/o de restricción de cinc, que no se expresan cuando el mismo aislado se cultiva en condiciones de restricción de hierro. Dado que los metales de transición son usados por los organismos para crear enzimas que catalicen las diversas reacciones bioquímicas, los iones metálicos pueden desempeñar un papel vital en la supervivencia microbiana durante una infección sistémica. Es quizás por esta razón que, durante la sepsis, se produce una reducción transitoria de la disponibilidad de estos metales de transición, haciendo que no estén disponibles para el crecimiento del organismo. Estas nuevas proteínas podrían aumentar muy bien la eficacia protectora de la composición existente cultivada en condiciones de restricción de hierro, porque también pueden ser expresadas por las bacterias en las condiciones de restricción de iones metálicos experimentadas durante la invasión sistémica.

Ejemplo 7

Las composiciones de la presente invención también se pueden producir en condiciones comerciales a gran escala.

Fermentación

Se usó un vial criogénico de la semilla de trabajo (2 ml en 10^9 UFC/ml) como se describe en el Ejemplo 1 para inocular 500 ml de caldo de soja triptico (TSB) sin dextrosa (Difco) previamente calentado hasta 37 °C que contenía 0,125 g/l de 2,2-dipiridilo (Sigma), 2,7 gramos de extracto de levadura BiTek (Difco) y glicerol (3 % vol/vol). Se

incubó el cultivo a 37 °C durante 12 horas mientras se agitaba a 200 rpm, momento en el que se usó para inocular 2 litros de los medios anteriores y se dejó crecer durante 4 horas más a 37 °C. Se usó este cultivo para inocular un fermentador de sobremesa de 20 litros de Virtis (Virtis, Gardiner, NY) cargado con 13 litros de los medios anteriormente descritos. Se mantuvo el pH constante entre 6,9 y 7,1 mediante valoración automática con NaOH al 50 % y HCl al 10 %. Se ajustó la velocidad de agitación a 400 rev/minuto, y se aireó el cultivo con 11 litros de aire/minuto a 37 °C. Se controló la formación de espuma automáticamente mediante la adición de 11 ml de antiespumante (Mazu DF 204 Chem/Serv, Minneapolis, MN). Se dejó crecer el cultivo de forma continua en estas condiciones durante 4 horas, y después se bombeó de forma estéril en un fermentador de 150 litros (W. B. Moore, Easton, PA). Se cargó el fermentador con 120 litros de caldo de soja tréptico sin dextrosa (3.600,0 gramos), extracto de levadura BiTek (600 gramos), glicerol (3.600 ml), 2,2-dipiridilo (3,0 gramos) y antiespumante Mazu DF 204 (60 ml). Los parámetros de la fermentación fueron los siguientes: el oxígeno disuelto (OD) se mantuvo al 30 % ± 10 % aumentando la agitación hasta 220 rev/minuto rociado con 60 litros de aire/minuto y 68,9476 kPa (10 psi) de contrapresión. El pH se mantuvo constante entre 6,9 y 7,1 mediante valoración automática con NaOH al 50 % y HCl al 10 %, y la temperatura se mantuvo a 37 °C. A las 4,5 horas (DO₅₄₀ = 8-9) de la fermentación, se transfirió el cultivo a un fermentador de 1,500 litros IF-15000 de New Brunswick Scientific cargado con 1.200 litros de caldo tréptico de soja sin dextrosa (36.000 gramos), extracto de levadura BiTek (6.000 gramos), glicerol (36.000 ml), 2,2-dipiridilo (30,0 gramos) y antiespumante Mazu DF 204 (600 ml). Los parámetros de la fermentación fueron los siguientes: el oxígeno disuelto (OD) se mantuvo al 60 % ± 10 % con oxígeno suplementario aumentando la agitación hasta 300 rev/minuto rociado con de 300 a 1.100 litros de aire/minuto y 34,4738 kPa (5 psi) de contrapresión. A medida que avanzaba la fermentación, se añadió oxígeno suplementario de 0-90 litros/minuto para ayudar en el control del oxígeno disuelto. El pH se mantuvo constante entre 6,9 y 7,4 mediante valoración automática con NaOH al 50 % y HCl al 10 %, y la temperatura se mantuvo a 37 °C.

Aproximadamente a las 5 horas de la inoculación del fermentador grande, se suplementó el cultivo con nutrientes adicionales mediante la carga de 70 litros de un medio que contenía 18.000 gramos de TSB y sin dextrosa, 3.000 gramos de extracto de levadura, 30,0 gramos de 2,2-dipiridilo y 18.000 ml de glicerol. Se ajustó la velocidad de la carga a aproximadamente 28 litros/hora, mientras se aumentaba la agitación. Al final de la carga, se dejó que la fermentación continuara durante 4 horas más, tras lo que se finalizó la fermentación mediante la reducción de la temperatura del fermentador a 18 °C (DO₅₄₀ = 35-40 en una dilución de 1:100).

30 *Recogida*

Se concentró la fermentación bacteriana y se lavó usando un Maxiset-25 de flujo tangencial de Pall Filtron (Pall Filtron Corporation, Northboro, MA) dotado de tres filtros de canal abierto Alfa 300-K de 2,79 m² (30 pies²), n.º de catálogo AS300C5, (Pall Filtron) conectado a una bomba de alimentación de Waukesha Modelo U-60 (Waukesha Cherry-Burrell, Delevan, WI). Se redujo el volumen de cultivo original de 1.250 litros a 50 litros (2,5 litros/minuto), usando una presión de entrada del filtro de 206,84 kPa (30 psi) y una presión de la fracción retenida de 34,47-41,37 kPa (5-6 psi). Se volvió a ajustar la fracción bacteriana retenida hasta 150 litros usando solución salina tamponada con Tris, pH 8,5, y luego se concentró de nuevo hasta 50 litros para ayudar a eliminar las proteínas exógenas contaminantes tales como las exoproteínas para incluir toxinas y proteasas secretadas. El pH elevado de la solución salina tamponada con Tris ayuda a evitar gran parte de la degradación proteolítica que puede ocurrir durante el almacenamiento de la suspensión de células enteras. Los inhibidores de proteasa se pueden usar en lugar de, o además de, un pH elevado. Se mezcló bien la fracción retenida en el tanque de 200 litros usando un mezclador accionado magnéticamente montado en la parte inferior. Se dispensó de forma estéril la fracción retenida (3,5 litros) en recipientes Nalgene estériles de 4 litros n.º 2122 y se dispuso en un congelador a -20 °C para su almacenamiento como punto de ruptura en la fabricación o para su posterior procesamiento. Se calculó la masa de sedimentos mediante la centrifugación de muestras de 30 ml del cultivo fermentado y la recogida final. En resumen, se centrifugaron tubos cónicos Nalgene de 50 ml previamente pesados a 39.000 x g durante 90 minutos en un centrifugador Beckman J2-21 usando un rotor JA-21 (Beckman Instruments, Palo Alto CA). Al finalizarse el ciclo, se separó el sobrenadante mediante vertido y se volvieron a pesar los tubos. Se calculó la masa de sedimentos para cada etapa. El proceso de fermentación produjo una masa de sedimentos húmedos de aproximadamente 60 kilogramos.

55 *Alteración*

Se transfirieron ochenta kilogramos de suspensión celular bacteriana en solución salina tamponada con Tris, pH 8,5, asépticamente a un tanque de procesamiento revestido de 1.000 litros colocado de vapor (Lee, Modelo 259LU) con un mezclador montado en la parte superior (Eastern, modelo TME-1/2, EMI Incorporated, Clinton, CT) que contenía 900 litros de TBS, pH 8,5. Se enfrió la suspensión bacteriana a granel hasta 4 °C con mezcla continua durante 18 horas a 200 rpm, momento en el que se alteró mediante homogenización. En resumen, se conectó el tanque de 1.000 litros que contenía la suspensión bacteriana a un homogeneizador Avestin modelo C-500-B (Avestin Inc, Ottawa Canadá). Se conectó un segundo tanque de procesamiento revestido de 1000 litros (vacío) al homogeneizador de modo que el fluido del tanque de procesamiento se pudiera pasar a través del homogeneizador, al tanque vacío y volver, permitiendo múltiples pasadas de homogenización, manteniendo un sistema cerrado. La temperatura durante la homogenización se mantuvo a 4 °C. Al comienzo de la primera pasada, se hizo circular el fluido a 482,633 kPa (70 psi) por una bomba modelo 10DO de Waukesha (Waukesha) a través del homogeneizador

(1892,7 litros/hora [500 galones/hora]), mientras se ajustaba la presión del homogeneizador a 206.842,72 kPa (30.000 psi). Antes de la primera pasada, se retiraron dos muestras previas a la homogenización del homogeneizador para establecer un valor inicial para la determinación del grado de alteración y la monitorización del pH. El grado de alteración se controló mediante la transmitancia (% de T a 540 nm en dilución a 1:100) en comparación con la muestra no homogenizada. Se normalizó el número de pasadas a través del homogeneizador para dar un porcentaje de transmitancia final de entre el 78 y el 91 % de T en una dilución a 1:100, preferentemente de entre el 86 y el 91 %. Tras la homogenización, se retiró el tanque del homogeneizador y se dispuso en un bucle de enfriadores en 4 °C y se mezcló a 240 rpm.

10 *Recogida de las proteínas*

Se recogió la suspensión bacteriana alterada que contenía las proteínas reguladas por el nivel de hierro ilustradas en la Figura 1 por centrifugación usando centrifugadoras Sharples T-1 (Alfa Laval Separations, Warminster, PA). En resumen, se cargó el tanque de procesamiento revestido de 1.000 litros que contenía el material bacteriano homogenizado alterado en 12 Sharples con una velocidad de carga de 250 ml/minuto a 117,211 kPa (17 psi) a una fuerza centrífuga de 60.000 x g. Se recogió el efluente en un segundo tanque de procesamiento revestido de 1.000 litros a través de un bucle estéril cerrado, permitiendo múltiples pasadas a través de las centrifugadoras, manteniendo un sistema cerrado. La temperatura durante la centrifugación se mantuvo a 4 °C. Se pasó el material homogenizado 8 veces a través de las centrifugadoras. Se recogió aproximadamente el 50 % de la proteína tras la segunda pasada, momento en el que se concentró el fluido homogenizado hasta 1/3 de su volumen original, acortando la duración del proceso para las 6 siguientes pasadas. Se desconectó el tanque de material homogenizado de forma aséptica de las centrifugadoras y se conectó a un montaje de filtración de flujo tangencial Millipore Pellicon (Millipore Corporation, Bedford, MA), dotado de un filtro Centrasette serie Alpha 3K con canales de detección de 2,32 m² (25 pies²) (Pall Filtron) conectado a una bomba de alimentación Waukesha Modelo U30 para la concentración. Tras la concentración, se continuó la centrifugación hasta que el proceso se hubo completado. La proteína se recogió tras cada pasada. Se recogió la proteína, se volvió a suspender y se dispensó en 50 litros de solución salina tamponada con Tris, pH 8,5 que contenía formulina al 0,15 % (Sigma) como conservante.

30 *Diafiltración*

Se lavó la suspensión de proteínas mediante diafiltración a 4 °C para eliminar las proteínas exógenas (proteasas, toxinas, enzimas citoplásmicas y metabólicas, etc.). En resumen, se transfirieron los 50 litros de proteína de forma estéril a un tanque de procesamiento de 200 litros que contenía 150 litros de solución salina tamponada con Tris estéril, pH 8,5, dotado de un mezclador Dayton, Modelo 2Z846, montado en la parte inferior (Dayton Electric, Chicago, IL) que giraba a 125 rev/minuto. Se conectó el tanque de procesamiento de forma estéril a un montaje de filtración de flujo tangencial Millipore Pellicon (Millipore Corporation), dotado de un filtro Centrasette serie Alpha 3K con canales de detección de 2,32 m² (25 pies²) (Pall Filtron) conectado a una bomba de alimentación Waukesha Modelo U30. Se concentró la solución de proteínas de 200 litros mediante filtración hasta un volumen final de 50 litros, momento en el que se añadieron 150 litros de solución salina estéril. A continuación, se concentró la suspensión de proteínas hasta aproximadamente 50 litros. El concentrado de proteínas se almacenó en un tanque de procesamiento revestido de 50 litros dotado de un mezclador montado en la parte superior y se almacenó a 4 °C.

Es interesante observar que la composición derivada del proceso a gran escala usando la homogenización como medio de alteración genera perfiles de bandas idénticos, examinados mediante SDS-PAGE, a los generados con el proceso a pequeña escala descrito en el Ejemplo 1. Estos resultados muestran que se podría reemplazar la lisostafina como agente de lisis bacteriana usando el homogeneizador Avestin C500-B. Este hallazgo permite la generación a bajo coste de grandes volúmenes de proteínas reguladas por el nivel de hierro a partir de estafilococos.

50 *Ejemplo 8*

Hiperinmunización de ratones y preparación de anticuerpo policlonal

La inmunización pasiva con anticuerpo purificado aislado de ratones vacunados con proteínas derivadas de las cepas 19636 de *S. aureus* cultivadas en condiciones limitantes en hierro fue protectora frente a un desafío homólogo y heterólogo con *S. aureus*. Se vacunaron quince ratones CD1 adultos como se describe en el Ejemplo 3 con la composición de proteína derivada de la cepa ATCC 19636 de *S. aureus* cultivada en condiciones de empobrecimiento de hierro como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Los ratones se vacunaron por vía intraperitoneal 3 veces a intervalos de 7 días con 50 µg de la composición de proteína en cada vacunación. Siete días después de la tercera inmunización, se sangraron los ratones por completo mediante punción cardiaca. Se combinó el suero y se purificó el anticuerpo usando precipitación con sulfato de amonio convencional. Se retiraron las proteínas séricas exógenas antes de la precipitación de los anticuerpos mediante la adición de 0,5 volúmenes de sulfato de amonio saturado, pH 7,2. Se agitó la solución a 100 rpm durante 24 horas a 4 °C. Se centrifugó la solución de nuevo a 3.000 x g durante 30 minutos. Se recogió el sobrenadante y se volvió a hacer precipitar mediante la adición de suficiente sulfato de amonio saturado para llevar la concentración final al 55 % de saturación. Se agitó la solución a 100 rpm durante 24 horas a 4 °C. Se centrifugó el precipitado a 3000 x g durante 30 minutos. Se volvió a suspender

el sedimento final de cada muestra en 2 ml de PBS a pH 7,2. Se sometieron a diálisis los anticuerpos precipitados usando una entubación de diálisis de corte molecular de 50.000 (Pierce, Rockford IL) durante 30 horas contra tres cambios de 1 litro de solución salina tamponada con fosfato para eliminar el sulfato de amonio. Los dos primeros litros de cambio se preservaron con azida de sodio al 0,02 %. El último cambio de 1 litro no contenía conservante. Se recogió la sustancia sometida a diálisis y se volvió a centrifugar para eliminar cualquier residuo restante a 3000 x g durante 30 minutos. La solución de anticuerpo se almacenó a 4 °C durante menos de 48 horas antes de su uso. Cada muestra se sembró en agar de sangre para verificar la esterilidad antes de la infusión.

Ejemplo 9

Inmunización pasiva y desafío

Para evaluar el efecto protector de los anticuerpos infundidos generados contra proteínas de *S. aureus* expresadas en condiciones de limitación del hierro, dos grupos de 15 ratones cada uno recibieron por infusión intraperitoneal bien preparado de anticuerpo purificado (Grupo 1) o solución salina fisiológica (Grupo 2) en una infusión de 200 µl. Otros dos grupos más de 15 ratones cada uno recibieron por infusión subcutánea bien preparado de anticuerpo purificado (Grupo 3) o solución salina fisiológica (Grupo 4). Tras 60 minutos, los 2 grupos de 15 ratones que habían recibido una infusión intraperitoneal fueron desafiados por vía intraperitoneal con $1,3 \times 10^8$ UFC de cepa 19636 de *S. aureus*. Del mismo modo, los 2 grupos de 15 ratones que habían recibido una infusión subcutánea fueron desafiados por vía subcutánea con $1,3 \times 10^8$ UFC de la cepa 1477 de *S. aureus* para ensayar la protección cruzada contra el desafío por una cepa diferente de *S. aureus*. Se registraron la mortalidad y/o el tamaño de las lesiones durante 5 días, y se extirpó el hígado de todos los ratones post-mortem, se homogenizó y se sembró para determinar el número de *S. aureus* presente como medida de la infección sistémica. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Figuras 5 y 6) muestran el efecto protector proporcionado por la infusión de anticuerpos de ratones vacunados con las proteínas de *S. aureus* expresadas en condiciones de restricción de hierro. Aunque la diferencia entre los grupos que habían recibido infusión y de control para los grupos desafiados con ATCC 19636 no fue significativa ($p = 0,076$, prueba de rango logarítmico), se cultivó el hígado del único ratón muerto del grupo de infusión de anticuerpos el Día 1 en agar de sangre para determinar la ausencia y/o la presencia del organismo del desafío (*S. aureus*). El cultivo derivado de este ratón fue negativo en *Staphylococcus* y no mostró crecimiento en la placa de agar de sangre ni de medio de cultivo. Por el contrario, los hígados de los ratones muertos del grupo de placebo, dieron todos positivo en la presencia de *Staphylococcus*. De hecho, se obtuvieron cultivos puros en cada placa de agar de sangre derivada de los hígados de estos ratones. Aunque los datos hepáticos no excluían la posibilidad de que la causa de la muerte del ratón del grupo de infusión de anticuerpos fuera la infección por *S. aureus*, la infección no fue sistémica, como lo fue en el grupo de placebo, y el ratón pudo haber muerto por otras razones. La censura de la muerte de este ratón que había recibido infusión de anticuerpos da lugar a una diferencia significativa entre los tratamientos con infusión de anticuerpos y con placebo ($p = 0,015$, prueba de rango logarítmico). Los datos del desafío cruzado, en el que los ratones recibieron infusión de anticuerpos generados tras la vacunación con proteínas derivadas de ATCC 19636 y desafiados con cepa 1477 de *S. aureus*, también mostraron una tendencia protectora. Entre 7 y 14 días después del desafío, todos los ratones de los grupos infundidos y no infundidos comenzaron a desarrollar lesiones cutáneas necróticas. Sin embargo, el examen macroscópico de los ratones reveló claramente un retraso visible en la formación de una lesión observable, así como la gravedad de la lesión entre los grupos. Los ratones infundidos desarrollaron lesiones más lentamente en comparación con los ratones no infundidos de control, que desarrollaron lesiones más rápido que los ratones infundidos y de mayor gravedad. Los ratones infundidos se curaron más rápido que los ratones no infundidos. Esto fue claramente evidente entre los 21 y los 35 días después de la inoculación. El examen macroscópico de los ratones a los 35 días del desafío mostró que los ratones no infundidos estaban gravemente desfigurados y reveló un mayor grado de cicatrización. De hecho, muchos de estos ratones perdieron la postura normal, ya que parecían estar retorcidos, en contraste con los ratones infundidos que casi no desarrollaron el extenso tejido cicatricial ni/o la desfiguración ilustradas por el aspecto retorcido desarrollado por los ratones no infundidos. En general, estos datos sugieren que la infusión intraperitoneal de anticuerpos dirigidos contra proteínas de *S. aureus* inducidas por hierro puede tanto proteger contra como limitar la gravedad de la infección por *S. aureus*.

Ejemplo 10

Evaluación de una composición de vacuna derivada de *Staphylococcus aureus* en una cabaña lechera infectada crónicamente

Se escogió una cabaña lechera comercial que tenía un historial de recuento de células somáticas crónicamente elevado atribuible a *Staphylococcus aureus* para la evaluación de una composición de vacuna descrita en el Ejemplo 1. El criterio para establecer la eficacia de la vacuna de este estudio experimental fue: 1) reducción de la incidencia de la mastitis clínica causada por *Staphylococcus aureus* entre los vacunados en comparación con los controles no vacunados; 2) mejora (es decir, una reducción) del recuento de células somáticas entre los animales vacunados en comparación con los controles; y 3) reducción de las tasas de aislamiento de cultivo positivo de *S. aureus* entre los vacunados y los controles no vacunados. La sangre se extraerá en el momento de la primera vacunación (día 0) y de nuevo a las 3 y 6 semanas después de la inmunización inicial. Las reacciones en el sitio de inyección o las reacciones sistémicas tras las vacunas se monitorizaron durante todo el estudio. Además, se cultivaron muestras de leche de tanque a granel y se enumeraron cuantitativamente para determinar si se había producido una reducción

del número de UFC de *Staphylococcus aureus* cultivadas tras la vacunación.

Se cultivaron tres de los aislados de *Staphylococcus* derivados de las vacas lactantes infectadas crónicamente de la cabaña en condiciones de restricción de hierro y en condiciones sin restricción de hierro como se describe en el Ejemplo 1. Los tres aislados se designaron TTX101, TTX102 y TTX103. Se examinaron las muestras extraídas por SDS-PAGE para comparar los perfiles de bandas entre los aislados. Se observaron perfiles de bandas idénticos entre los aislados examinados; las composiciones fabricadas de cada aislado incluían proteínas que tenían pesos moleculares de 87,73 kDa, 80,46 kDa, 65,08 kDa, 54,53 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa, 33,0 kDa y 31,83 kDa. Estas proteínas tienen los mismos pesos moleculares descritos anteriormente en la Tabla 10. Además, al comparar los aislados, se observaron perfiles de bandas idénticos con aquellas proteínas que se expresaron en todas las condiciones que no estaban reguladas por el nivel de hierro: 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa y 40 kDa. Estos resultados coincidieron con las observaciones anteriores. Se escogió un aislado designado TTX101 como el aislado para la fabricación de una composición para su uso en este estudio.

Ejemplo 11

Preparación de la vacuna de *Staphylococcus aureus* (TTX101)

Se preparó una composición como se describe en el Ejemplo 1 usando el aislado TTX101. La composición incluía proteínas expresadas en condiciones de empobrecimiento de hierro, que tenían pesos moleculares de 87,73 kDa, 80,46 kDa, 65,08 kDa, 54,53 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa, 33,0 kDa y 31,83 kDa, así como proteínas no reguladas por el nivel de metal, que tenían pesos moleculares de 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa y 40 kDa. Se usó la composición inmunizante derivada de la cepa TTX101 para preparar la vacuna experimental mediante la emulsión de la suspensión de proteína extraída (400 µg de proteínas en total por mililitro) en un adyuvante comercial (EMULSIGEN, MVP Laboratories, Ralston NE) usando un recipiente homogeneizador Ultra Turrax T-50 de IKA (IKA, Cincinnati, OH), dando una dosis final de 800 µg de proteína total en un volumen inyectable de 2,0 ml con una concentración de adyuvante del 22,5 % vol/vol. La vacuna se administró por vía subcutánea 2 veces en intervalos de 21 días.

Ejemplo 12

Diseño experimental y vacunación de la cabaña

Dieciocho días antes de la primera vacunación, se analizaron todas las vacas lactantes incluidas en el estudio (N = 80) para determinar la presencia de *S. aureus* a través de métodos de cultivo bacteriológico aeróbicos estandarizados mediante el cultivo de las muestras de leche individuales derivadas de cada vaca lactante. Además, los conteos de células somáticas (SCC) fueron realizados por la Asociación de Mejora de las Cabañas Lecheras usando métodos convencionales. Catorce de las 80 vacas fueron diagnosticadas clínicamente de mastitis y dieron positivo en *S. aureus*. El resto de las vacas (N = 66) dieron negativo en *S. aureus*. Se dividieron las ochenta vacas en partes iguales en dos grupos designados Grupo 1, animales vacunados (N = 40), y Grupo 2, animales no vacunados (N = 40). Las catorce vacas positivas en *Staphylococcus* diagnosticadas clínicamente se distribuyen por igual entre los dos grupos para que cada grupo de estudio contuviera 7 vacas con mastitis clínica. El SCC medio entre los grupos antes de la primera vacunación fue de 203,219 en los controles no vacunados en comparación con 240,443 en los animales vacunados ($p = 0,7$ no estadísticamente diferente).

Dieciocho días después de la primera extracción de muestras, se vacunaron todas las vacas del Grupo 1 por vía subcutánea en el hombro superior derecho con 2 ml de vacuna descrita en el Ejemplo 11. Diez días después de la primera vacunación, se extrajeron muestras de leche en este período de tiempo mediante el DHIA para el recuento de las células somáticas de cada una de las vacas. Las muestras de leche no se analizaron bacteriológicamente en este período de tiempo para determinar la presencia de *Staphylococcus*. La diferencia en el SCC entre los grupos en este período de tiempo fue de 125,241 (animales vacunados) en comparación con 196,297 (controles). Esta fue una diferencia del 36 % en el número de células somáticas entre los animales vacunados en comparación con los controles no vacunados. La diferencia en el SCC entre los controles y los animales vacunados en este período de muestreo no fue estadísticamente diferente ($p = 0,5$). La falta de diferencia estadística en el SCC entre los grupos en los dos períodos de muestreo se debió a la gran variación en el SCC individual entre las vacas. También se examinó el sitio de inyección de cada vaca vacunada en este mismo período de tiempo. Ninguna de las vacas examinadas mostró una reacción adversa en el tejido del sitio de inyección según un examen físico. Además, no hubo pérdida apreciable en la producción de leche debido a la vacunación.

Veintiún días después de la primera vacunación, todas las vacas del Grupo 1 (animales vacunados) recibieron una segunda vacunación o refuerzo. Durante el período de tiempo entre la primera y la segunda vacunación, las vacas de ambos grupos (animales vacunados y controles) desarrollaron lesiones en los pezones debido a una caída drástica de la temperatura ambiental que dio lugar a la formación de lesiones en el extremo del pezón, dando lugar al desarrollo de infecciones en los pezones y aumentando potencialmente el aislamiento de *Staphylococcus* durante el muestreo, lo que se observó en el tercer período de muestreo. Veintitrés días después de la segunda vacunación,

se extrajeron muestras de leche mediante el DHIA para el recuento de las células somáticas de cada una de las vacas. Las muestras de leche también se analizaron bacteriológicamente para determinar la presencia de *Staphylococcus aureus*. Hubo un aumento drástico en la tasa de aislamiento de *S. aureus* en este período de tiempo en las vacas que habían dado negativo en el primer período de muestreo. En los controles no vacunados, el 42,9 % de estas vacas ahora dio positivo en *S. aureus*, en contraste con los animales vacunados, que solo mostraron un aumento del 35,5 %. Esta fue una diferencia del 7,4 % entre los animales vacunados en comparación con los controles no vacunados. Es difícil decir que la mejora en la tasa de aislamiento de *S. aureus* del grupo vacunado se debió solo al efecto de la vacuna. No se puede pasar por alto la dificultad en la obtención de muestras de leche de las vacas con daños en los pezones, que podría aumentar el potencial de contaminación de la leche por *S. aureus* en la obtención de la muestra. Sin embargo, hubo una diferencia significativa en el SCC medio entre los animales vacunados en comparación con los controles. El SCC medio del grupo vacunado fue de 222,679 en comparación con 404,278 células somáticas medidas en el grupo de control. Esta fue una diferencia del 44,9 % entre los animales vacunados en comparación con los controles no vacunados. Es interesante especular que la diferencia observada en el SCC entre estos grupos coincide con la diferencia en la tasa de aislamiento de *S. aureus* entre los grupos. Sin embargo, debido a la gran variación en el SCC entre los animales individuales y el pequeño tamaño de la muestra del ensayo experimental en el número de animales, la diferencia no fue estadísticamente diferente ($p = 0,28$).

En este mismo período de tiempo, se examinó el sitio de la inyección de cada vaca vacunada para determinar cualquier reacción adversa en el tejido que pudiera estar causada por la composición de la vacuna. Ninguna de las vacas examinadas mostró reacción adversa alguna en el sitio de inyección según un examen físico. Las composiciones de vacuna parecían ser altamente compatibles con los tejidos y no causaron ninguna pérdida apreciable en la producción de leche tras cada vacunación.

Se prosigue con la monitorización de las vacas mediante la medición del SCC y las muestras de leche para determinar la presencia o la ausencia de *Staphylococcus aureus*. Algunas de las vacas de cada grupo se vacunan por tercera vez a los 42 días de la segunda vacunación. Parece que hay una diferencia que favorece el uso de la composición de vacuna para la reducción de los recuentos de células somáticas y el control de la infección causada por *Staphylococcus aureus*. La monitorización posterior incluye la serología basada en los títulos de los anticuerpos hacia la composición de vacuna, los cambios en la producción de leche en las vacas vacunadas debido a la mejora en la salud y la reducción del SCC de los animales vacunados en comparación con las cohortes no vacunadas. Además, se realizan otros experimentos para investigar el índice de protección de la vacuna basándose en la respuesta a la dosis tras el desafío con un *S. aureus* virulento.

Ejemplo 13

Dado que se ha demostrado que los pesos moleculares de las proteínas entre las diferentes cepas de *S. aureus* son similares y que se observó protección heteróloga en el estudio de desafío en los ratones, se ha tratado de determinar si las proteínas que comparten pesos moleculares similares en la Figura 1 eran proteínas similares. La técnica escogida para caracterizar las proteínas fue espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-MS). Una parte de la composición se resolvió mediante SDS-PAGE como se describe en el Ejemplo 1, y se tiñó el gel con azul de Coomassie Brilliant para visualizar las proteínas.

Materiales y métodos

Escisión y lavado. Se lavó el gel durante 10 minutos con agua dos veces. Se escindió cada banda de proteína de interés cortando tan cerca de la banda de proteína como fue posible para reducir la cantidad de gel presente en la muestra.

Se cortó cada corte de gel en cubos de 1 x 1 mm y se colocaron en un tubo de 1,5 ml. Se lavaron los fragmentos de gel con agua durante 15 minutos. Todos los volúmenes de disolvente usados en las etapas de lavado eran aproximadamente iguales al doble del volumen del corte de gel. A continuación, se lavó el corte de gel con agua/acetronitrilo (1:1) durante 15 minutos. Cuando las proteínas se hubieron teñido con plata, se retiró la mezcla de agua/acetronitrilo, se secaron los fragmentos de gel en un SpeedVac (ThermoSavant, Holbrook, NY) y después se redujeron y se sometieron a alquilación como se describe más adelante. Cuando los fragmentos de gel no se teñieron de plata, se retiró la mezcla de agua/acetronitrilo, y se añadió acetronitrilo para cubrirlos hasta que los fragmentos de gel se volvieron de un blanco pegajoso, tras lo que se retiró el acetronitrilo. Se rehidrataron los fragmentos de gel en NH_4HCO_3 100 mM, y tras 5 minutos, se añadió un volumen de acetronitrilo igual al doble del volumen de los fragmentos de gel. Se incubó esto durante 15 minutos, se retiró el líquido y se secaron los fragmentos de gel en un SpeedVac.

Reducción y alquilación. Se rehidrataron los fragmentos de gel secos en DTT 10 mM y NH_4HCO_3 100 mM, y se incubaron durante 45 minutos a 56 °C. Tras permitir que los tubos se enfriaran hasta la temperatura ambiente, se retiró el líquido y se añadió de inmediato el mismo volumen de una mezcla de yodoacetamida 55 mM y NH_4HCO_3 100 mM. Se incubó esto durante 30 minutos a temperatura ambiente a oscuras. Se retiró el líquido, se añadió acetronitrilo para cubrir hasta que los fragmentos de gel se volvieron de un blanco pegajoso, tras lo que se retiró el

acetónitrilo. Se rehidrataron los fragmentos de gel en NH_4HCO_3 100 mM, y tras 5 minutos, se añadió un volumen de acetónitrilo igual al doble del volumen de los fragmentos de gel. Se incubó esto durante 15 minutos, se retiró el líquido y se secaron los fragmentos de gel en un SpeedVac. Si el gel se tiñó con azul de Coomassie, y seguía quedando azul de Coomassie residual, se repitió el lavado con NH_4HCO_3 100 mM/acetónitrilo.

Digestión en gel. Se secaron por completo los fragmentos de gel en una Speed Vac. Se rehidrataron los fragmentos en tampón de digestión (NH_4HCO_3 500 mM, CaCl_2 5 mM y 12,5 nanogramos por microlitro (ng/ μl) de tripsina) a 4 °C. Se añadió suficiente tampón para cubrir los fragmentos de gel, y se añadió más cuando fue necesario. Se incubaron los fragmentos de gel en hielo durante 45 minutos, y se retiró el sobrenadante y se reemplazó por 5-2 μl de mismo tampón sin tripsina. Se incubó esto a 37 °C durante la noche en una incubadora de aire.

Extracción de los péptidos. Se añadió un volumen suficiente de NH_4HCO_3 25 mM para cubrir los fragmentos de gel, y se incubó durante 15 minutos (normalmente en un sonicador de baño). Se añadió el mismo volumen de acetónitrilo y se incubó durante 15 minutos (en un sonicador de baño cuando fue posible), y se recuperó el sobrenadante. La extracción se repitió dos veces, usando ácido fórmico al 5 % en lugar de NH_4HCO_3 . Se añadió un volumen suficiente de ácido fórmico al 5 % para cubrir los fragmentos de gel, y se incubó durante 15 minutos (normalmente en un sonicador de baño). Se añadió el mismo volumen de acetónitrilo y se incubó durante 15 minutos (normalmente en un sonicador de baño), y se recuperó el sobrenadante. Se combinaron los extractos, y se añadió DTT 10 mM hasta una concentración final de DTT 1 mM. Se secó la muestra en un SpeedVac hasta un volumen final de aproximadamente 5 μl .

Desalación de los péptidos. Se desalaron las muestras usando puntas de pipeta ZipTip (C18, Millipore, Billerica, MA) según lo sugerido por el fabricante. En resumen, se reconstituyó una muestra en solución de reconstitución (acetónitrilo: H_2O , 5:95, ácido trifluoroacético del 0,1 % al 0,5 %), se centrifugó y se comprobó el pH para verificar que era inferior a 3. Se hidrató una ZIPTIP mediante la aspiración de 10 μl de solución 1 (acetónitrilo: H_2O , 50:50, ácido trifluoroacético al 0,1 %) y desechando las partes alícuotas aspiradas. A esto, le siguió la aspiración de 10 μl de solución 2 (ácido trifluoroacético al 0,1 % en H_2O desionizada) y el desechado de las partes alícuotas aspiradas. Se cargó la muestra en la punta mediante la aspiración de 10 μl de la muestra lentamente en la punta, expulsándolos en el tubo de muestra, y repitiendo esto de 5 a 6 veces. Se aspiraron diez microlitros de la solución 2 en la punta, se desechó la solución mediante su expulsión, y se repitió este proceso 5-7 veces para lavar. Los péptidos se eluyeron mediante la aspiración de 2,5 μl de solución 3 enfriada con hielo (acetónitrilo: H_2O , 60:40, ácido trifluoroacético al 0,1 %), expulsando, y luego volviendo a aspirar la misma parte alícuota dentro y fuera de la punta 3 veces. Una vez expulsada la solución de la punta, el tubo se tapó y se almacenó en hielo.

Cartografía de péptidos mediante espectrometría de masas. Se suspendieron los péptidos en de 110 μl a 30 μl de ácido fórmico al 5 %, y se analizaron mediante MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA). Se determinó el espectro de masas de los fragmentos peptídicos según lo sugerido por el fabricante. En resumen, se mezcló una muestra que contenía los péptidos resultantes de una digestión triptica con ácido ciano-4-hidroxicinámico matriz, se transfirió a una diana, y se dejó secar. Se dispuso la muestra seca en el espectrómetro de masas, se irradió y se detectó el tiempo de vuelo de cada ion, y se usó para determinar un identificador genético de masa peptídico para cada proteína presente en la composición. Los polipéptidos conocidos se usaron para normalizar la máquina.

Análisis de los datos. Se compararon las masas observadas experimentalmente para los péptidos en cada espectro de masas con las masas esperadas de las proteínas usando el método de búsqueda de identificadores genéticos de masa de péptidos del motor de búsqueda Mascot (Matrix Science Ltd., Londres, RU, y www.matrixscience.com, véase Perkins *et al.*, "Electrophoresis" 20, 3551-3567 (1999)). Los parámetros de búsqueda incluyeron: base de datos = MSDB o BCNlnr; taxonomía = bacterias (eubacterias) o Firmicutes (bacterias gram positivas); tipo de búsqueda = identificador genético de masa de péptido; enzima = tripsina; modificaciones fijas = carbamidometilo (C) o nada; modificaciones variables = oxidación (M), carbamidometilo (C), la combinación o nada; valores de masa = monoisotópica; masa proteica = sin restricciones; tolerancia de la masa peptídica = entre ± 150 ppm y ± 430 ppm; o ± 1 Da; estado de carga peptídica, Mr; escisiones máx perdidas = 0 o 1; número de consultas = 20.

Resultados

El resultado de esta búsqueda fue un identificador genético de masa para cada proteína presente en la composición, que se muestra en las Tablas 2, 3, 4 y 5.

REIVINDICACIONES

1. Una composición obtenida mediante un proceso que comprende:
 - 5 proporcionar un cultivo que comprende un *Staphylococcus aureus*, en donde el *Staphylococcus aureus* ha sido adaptado al crecimiento en condiciones de bajo nivel de hierro mediante el subcultivo del *Staphylococcus aureus* en medio que contiene concentraciones crecientes de 2,2'-dipiridilo de 300 μM a 1.600 μM , y en donde el *Staphylococcus aureus* se cultiva en presencia de 1.600 μM de 2,2'-dipiridilo;
 - 10 alterar el *Staphylococcus aureus* para producir una mezcla de células de *Staphylococcus aureus* rotas; disolver la mezcla para producir un preparado que contiene proteínas disueltas y no disueltas; y aislar las proteínas no disueltas,
 - en donde el *Staphylococcus aureus* es la cepa ATCC 19636 de *S. aureus*.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición comprende polipéptidos aislados que tienen pesos moleculares de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa y 33 kDa, en donde el peso molecular está determinado por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida, y en donde la composición protege a un animal contra la exposición a la cepa ATCC 19636 de *S. aureus*.
3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en medicina.
4. El uso de una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección en un sujeto que tiene o que está en riesgo de tener una infección provocada por un *Staphylococcus aureus*.
5. El uso de una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un síntoma en un sujeto que tiene una infección causada por un *Staphylococcus aureus*.
6. El uso de las reivindicaciones 4 o 5, en el que el sujeto es un mamífero.
7. El uso de la reivindicación 6, en el que el mamífero es un ser humano.
8. El uso de una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una infección en un sujeto que tiene o que está en riesgo de tener una infección causada por un *Staphylococcus aureus*, en donde se reduce la colonización en el sujeto colonizado por *Staphylococcus aureus*.
9. La composición de la reivindicación 1 que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en el tratamiento de una infección en un sujeto que tiene o que está en riesgo de tener una infección causada por *Staphylococcus aureus*.
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en el tratamiento de un síntoma en un sujeto que tiene una infección causada por *Staphylococcus aureus*.
12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en el tratamiento de una infección en un sujeto que tiene o que está en riesgo de tener una infección causada por *Staphylococcus aureus*, en donde se reduce la colonización en el sujeto colonizado por *Staphylococcus aureus*.

Figura 1

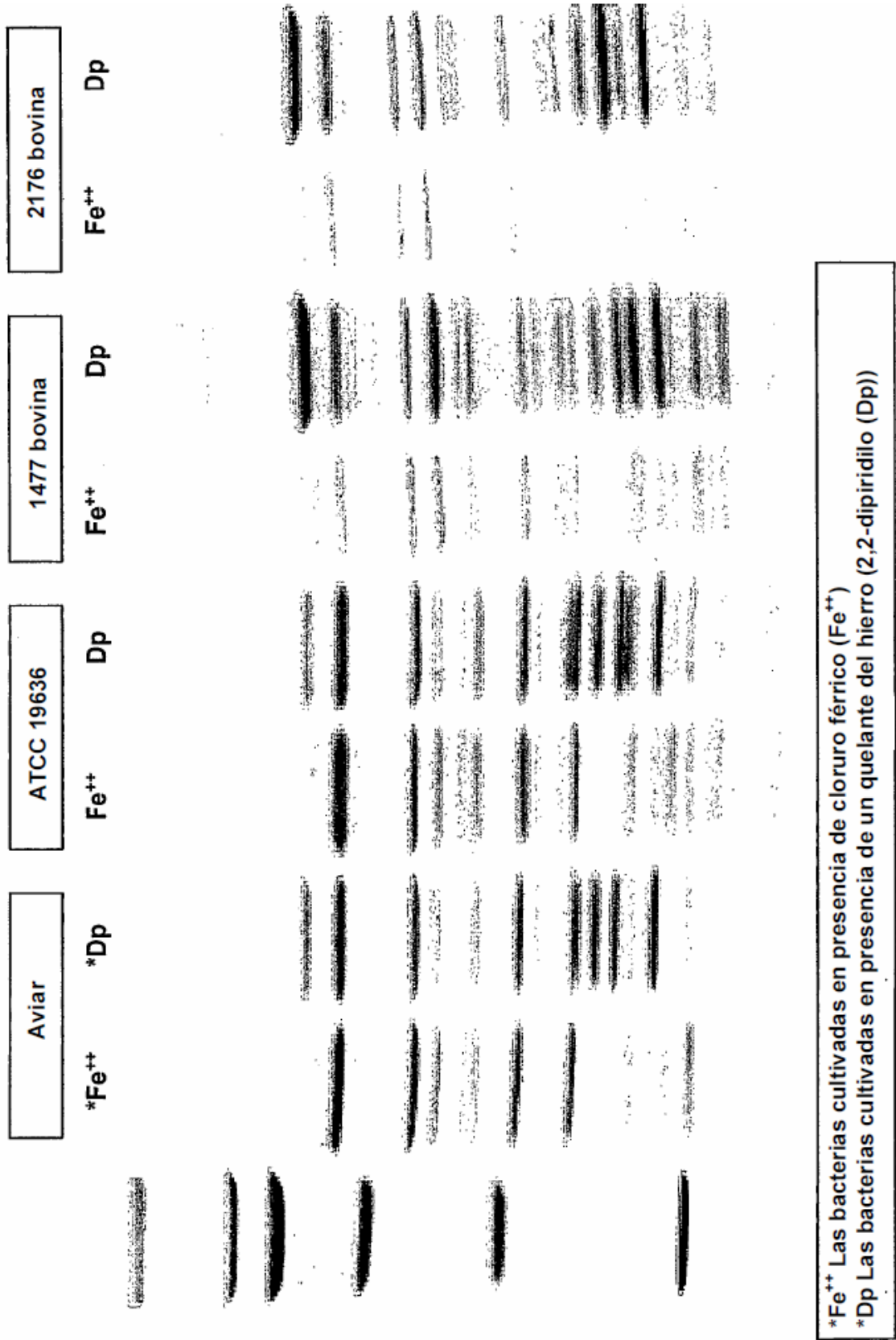


Figura 2

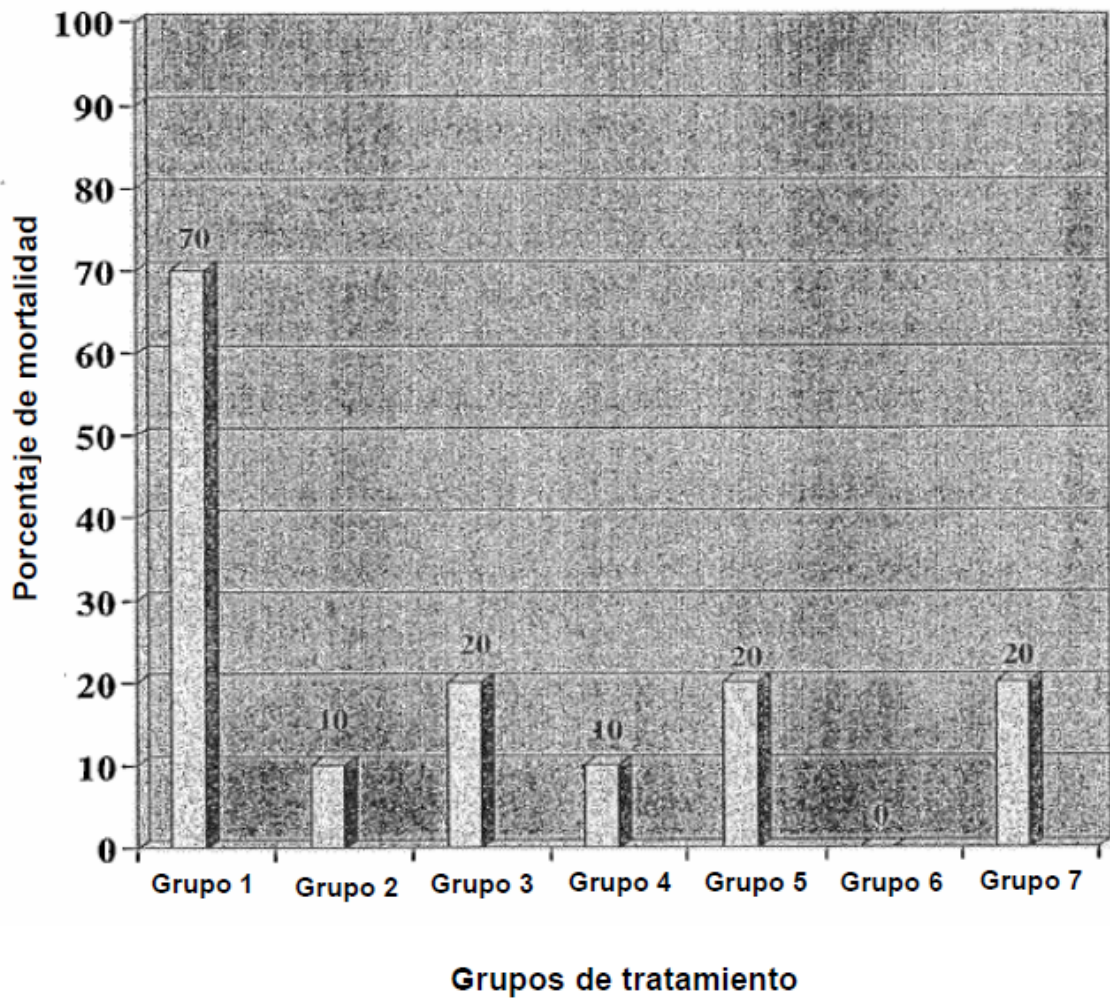


Figura 3

Curva de supervivencia de Kaplan- Meier que muestra el porcentaje de supervivencia tras la vacunación y el desafío homólogo con ATCC19636 de *S. aureus*

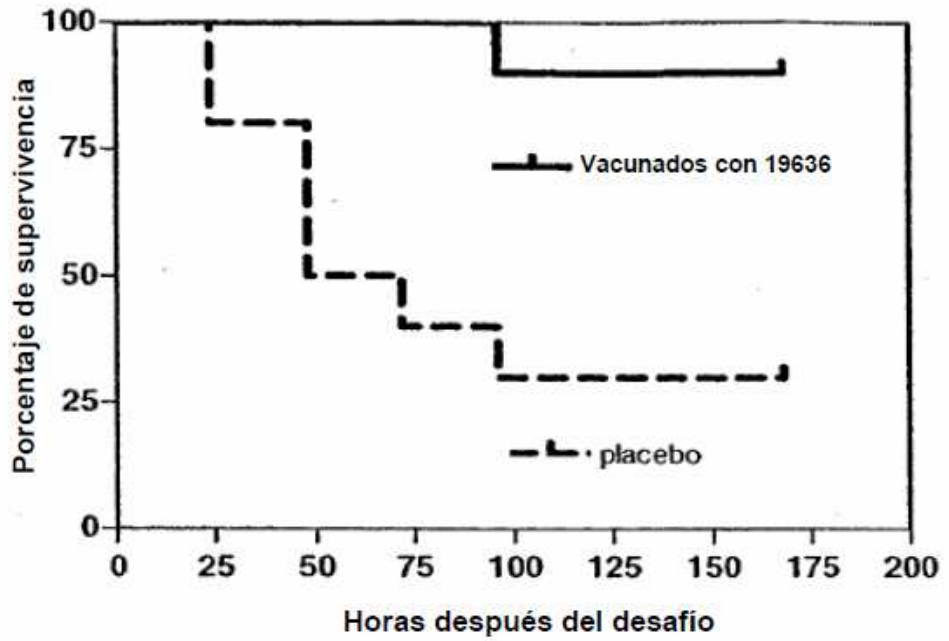


Figura 4

Curva de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra el porcentaje de supervivencia tras la vacunación y el desafío heterólogo con ATCC19636 de *S. aureus*

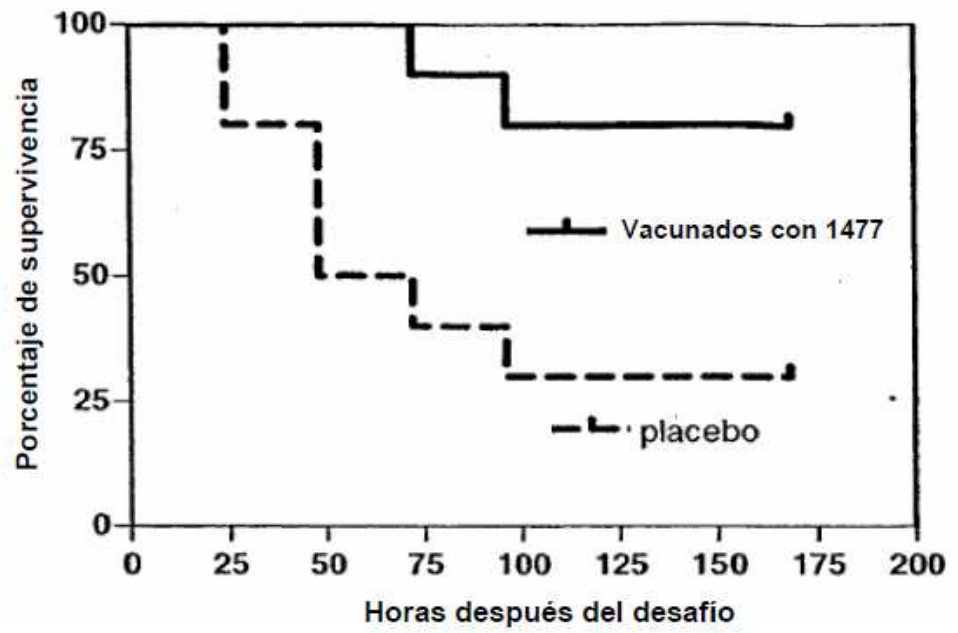


Figura 5

Curva de supervivencia de Kaplan- Meier que muestra el porcentaje de supervivencia tras la inmunización pasiva y el desafío homólogo con ATCC19636 de *S. aureus*

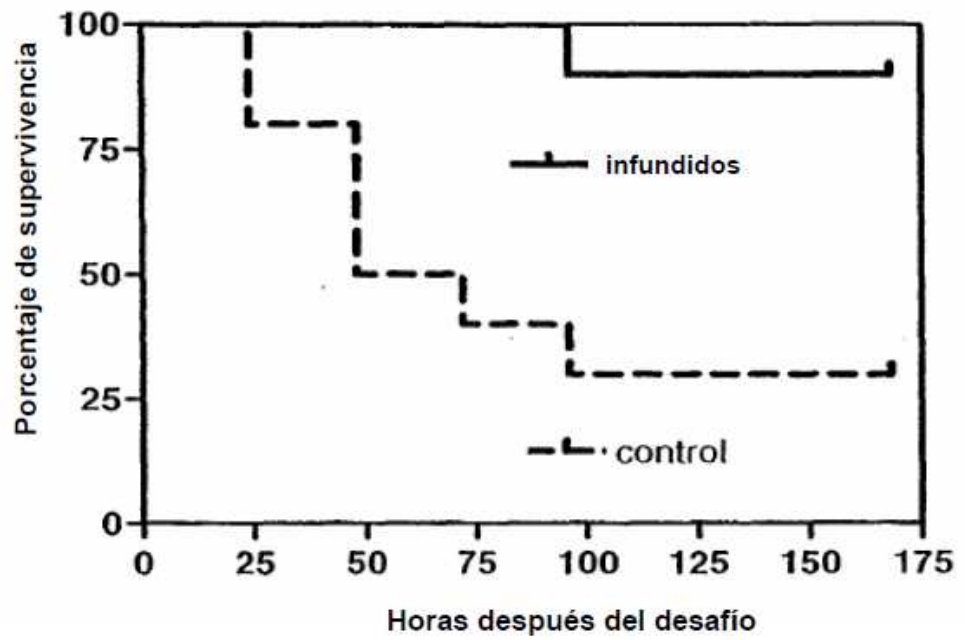


Figura 6

Curva de supervivencia de Kaplan- Meier que muestra el porcentaje de supervivencia tras la inmunización pasiva y el desafío heterólogo con 1477 de *S. aureus*

