

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 927**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2006 PCT/US2006/001665**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.07.2006 WO06078680**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2006 E 06718701 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 1843785**

54 Título: **Polipéptidos para inducir una respuesta inmunitaria protectora contra Staphylococcus aureus**

30 Prioridad:

21.01.2005 US 645811 P

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

17.11.2016

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 EAST LINCOLN AVENUE
RAHWAY, NJ 07065-0907, US**

72 Inventor/es:

**KELLY, ROSEMARIE;
SCHULTZ, LOREN, D.;
MILLER, MARK, A.;
YEAGER, MARK, D. y
MCNEELY, TESSIE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 589 927 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 para inducir una respuesta inmunitaria protectora contra *Staphylococcus aureus*

5 **Antecedentes de la invención**

5 *Staphylococcus aureus* es un patógeno responsable de una amplia gama de enfermedades y afecciones. Los ejemplos de enfermedades y afecciones causadas por *S. aureus* incluyen bacteriemia, endocarditis infecciosa, foliculitis, furunculosis, ántrax, impétigo, impétigo bulloso, celulitis, botriomicosis, síndrome del shock tóxico, 10 síndrome de la piel escaldada, infecciones del sistema nervioso central, enfermedades oftalmológicas infecciosas e inflamatorias, osteomielitis y otras infecciones de articulaciones y huesos, e infecciones de las vías respiratorias. (The Staphylococci in Human Disease, Crossley and Archer (eds.), Churchill Livingstone Inc. 1997).

15 Pueden emplearse estrategias con base inmunológica para controlar infecciones por *S. aureus* y la diseminación de *S. aureus*. Las estrategias con base inmunológica incluyen inmunización pasiva y activa. La inmunización pasiva emplea inmunoglobulinas dirigidas a *S. aureus*. La inmunización activa induce respuestas inmunitarias contra *S. aureus*.

20 Posibles vacunas para *S. aureus* están dirigidas a polisacáridos y a polipéptidos de *S. aureus*. El establecimiento de la diana puede conseguirse usando polisacáridos o polipéptidos de *S. aureus* adecuados como componentes de vacuna. Los ejemplos de polisacáridos que pueden emplearse como posibles componentes de vacuna incluyen polisacáridos capsulares de tipo 5 y tipo 8 de *S. aureus*. (Shinefield et al., N. Eng. J. Med. 346: 491-496, 2002). Los ejemplos de polipéptidos que pueden emplearse como posibles componentes de vacuna incluyen adhesina de colágeno, proteínas de unión a fibrinógeno, y factor de aglutinación. (Mamo et al., FEMS Immunology and Medical 25 Microbiology 10: 47-54, 1994, Nilsson et al., J. Clin. Invest. 101: 2640-2649, 1998, Josefsson et al., The Journal of Infectious Diseases 184: 1572-1580, 2001).

30 Se ha obtenido información relativa a las secuencias polipeptídicas de *S. aureus* a partir de la secuenciación del genoma de *S. aureus*. (Kuroda et al., Lancet 357: 1225-1240, 2001, Baba et al., Lancet 359: 1819-1827, 2000, Kunsch et al., publicación de patente europea EP 0 786 519, publicada el 30 de julio de 1997). En cierta medida, se ha empleado bioinformática en esfuerzos por caracterizar secuencias polipeptídicas obtenidas a partir de la secuenciación del genoma. (Kunsch et al., publicación de patente europea EP 0 786 519, publicada el 30 de julio de 1997).

35 El documento WO 02/094868 desvela más de 2800 polipéptidos de *S. aureus* incluyendo un polipéptido idéntico al polipéptido con la SEQ ID N.º 1 de la presente divulgación.

40 Se han usado técnicas tales como aquellas que implican tecnología de presentación y sueros de pacientes infectados se han usado en un esfuerzo por ayudar a identificar genes que codifican potenciales antígenos. (Foster et al., número de publicación internacional WO 01/98499, publicada el 27 de diciembre de 2001, Meinke et al., número de publicación internacional WO 02/059148, publicada el 1 de agosto de 2002, Etz et al., PNAS 99: 6573-6578, 2002).

45 **Sumario de la invención**

La presente invención presenta inmunógenos polipeptídicos que comprenden una secuencia de aminoácidos con hasta 9 alteraciones respecto a la SEQ ID NO: 1 en los que dicho polipéptido proporciona inmunidad protectora contra *S. aureus*, y en los que dicho inmunógeno polipeptídico no es el polipéptido de la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 tiene una secuencia AhpC de *S. aureus* de longitud completa. Se descubrió que un derivado de SEQ ID NO: 1 50 que contenía una etiqueta de histidina en el extremo amino y tres aminoácidos adicionales en el extremo carboxilo, producía una respuesta inmunitaria protectora contra *S. aureus*.

La referencia a inmunidad o respuesta inmunitaria "protectora" indica un nivel detectable de protección contra infección por *S. aureus*. El nivel de protección puede evaluarse usando modelos animales tales como los descritos 55 en el presente documento.

La referencia a inmunógeno indica la capacidad de proporcionar inmunidad protectora contra *S. aureus*.

60 El porcentaje de identidad (también denominado porcentaje de idénticos) con una secuencia de referencia se determina alineando la secuencia polipeptídica con la secuencia de referencia y determinar el número de aminoácidos idénticos en las regiones correspondientes. Este número se divide por el número total de aminoácidos en la secuencia de referencia (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) y a continuación se multiplica por 100 y se redondea al número entero más cercano.

65 Otro aspecto de la presente invención describe un inmunógeno para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia que comprende un polipéptido que proporciona inmunidad protectora contra *S. aureus* y

una o más regiones o restos adicionales unidas covalentemente al polipéptido en el extremo carboxilo o en el extremo amino, en el que cada región o resto se selecciona independientemente entre una región o resto que tiene al menos una de las siguientes propiedades: mejora la respuesta inmunitaria, facilita la purificación o facilita la estabilidad del polipéptido.

5 Referencia a “región o resto adicional” indica una región o resto diferente de una región AhpC de *S. aureus*. La región o resto adicional puede ser, por ejemplo, una región polipeptídica o una región no peptídica adicional.

10 Referencia a “purificado/a” o “sustancialmente purificado/a” no requiere que un polipéptido experimente purificación alguna y puede incluir, por ejemplo, un polipéptido sintetizado químicamente que no ha sido purificado.

También se desvela una composición capaz de inducir inmunidad protectora contra *S. aureus* en un paciente. La composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad inmunológicamente eficaz de un inmunógeno que proporciona inmunidad protectora contra *S. aureus*.

15 Una cantidad inmunológicamente eficaz es una cantidad suficiente para proporcionar inmunidad protectora contra infección por *S. aureus*. La cantidad debe ser suficiente para impedir significativamente la probabilidad o gravedad de una infección por *S. aureus*.

20 También se desvela un ácido nucleico que comprende un gen recombinante que codifica un polipéptido que proporciona inmunidad protectora contra *S. aureus*. Un gen recombinante contiene ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido junto con elementos reguladores para transcripción y procesamiento apropiados (que pueden incluir elementos traduccionales y postraduccionales). El gen recombinante puede existir independiente del genoma de un huésped o puede ser parte del genoma de un huésped.

25 Un ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico que, en virtud de su secuencia y/o forma no se encuentra en la naturaleza. Los ejemplos de ácido nucleico recombinante incluyen ácido nucleico purificado, dos o más regiones de ácido nucleico combinadas entre sí que proporcionan un ácido nucleico diferente del que se encuentra en la naturaleza, y la ausencia de una o más regiones de ácido nucleico (por ejemplo, regiones cadena arriba o cadena abajo) que se asocian de forma natural entre sí.

30 También se desvela una célula recombinante. La célula comprende un gen recombinante que codifica un polipéptido que proporciona inmunidad protectora contra *S. aureus*.

35 También se desvela un método de preparación de un polipéptido que proporciona inmunidad protectora contra *S. aureus*. El método implica cultivar una célula recombinante que contiene ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido y purificar el polipéptido.

40 También se desvela un polipéptido que proporciona inmunidad protectora contra *S. aureus* preparado mediante un proceso que comprende las etapas de cultivar una célula recombinante que contiene ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido en un huésped y purificar el polipéptido. Pueden emplearse diferentes células huésped.

45 Referencia a “aislado/a” indica una forma diferente de la encontrada en la naturaleza. La forma diferente puede ser, por ejemplo, una pureza diferente de la encontrada en la naturaleza y/o una estructura que no se encuentra en la naturaleza. Una estructura que no se encuentra en la naturaleza incluye estructuras recombinantes donde diferentes regiones se combinan entre sí, por ejemplo, anticuerpos humanizados donde una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) murinas se insertan en una matriz de soporte en marco humana, anticuerpos híbridos donde una o más CDR de una proteína de unión a anticuerpos se insertan en una matriz de soporte en marco diferente, y anticuerpos derivados de secuencias humanas naturales donde genes que codifican dominios variables ligeros y pesados se combinaron aleatoriamente entre sí.

50 La proteína aislada está de forma preferentemente sustancial libre de proteínas del suero. Una proteína sustancialmente libre de proteínas del suero está presente en un entorno que carece de la mayoría o de todas las proteínas del suero.

55 A menos que términos particulares sean mutuamente excluyentes, la referencia a “o” indica cualquiera o ambas posibilidades. Ocasionalmente se usan expresiones tales como “y/o” para destacar cualquiera o ambas posibilidades.

60 Referencia a términos abiertos tales como “comprende” permite elementos o etapas adicionales. Ocasionalmente se usan expresiones tales como “uno/a o más” con o sin términos abiertos para destacar la posibilidad de elementos o etapas adicionales.

65 A menos que se indique explícitamente, la referencia a términos tales como “un” o “uno” no está limitada a uno. Por ejemplo, “una célula” no excluye “células”. Ocasionalmente se usan expresiones tales como uno/a o más para destacar la posible presencia de una pluralidad.

Otras características y ventajas de la presente invención son evidentes a partir de las descripciones adicionales proporcionadas en el presente documento que incluyen los diferentes ejemplos. Los ejemplos proporcionados ilustran diferentes componentes y metodología útiles en la puesta en práctica de la presente invención. Los ejemplos no limitan la invención reivindicada. Basándose en la presente divulgación el experto en la materia puede identificar y emplear otros componentes y metodología útiles para poner en práctica la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2. La secuencia completa es la SEQ ID NO: 2. La parte mostrada en negrita es la SEQ ID NO: 1. Las regiones subrayadas son una región de etiqueta de histidina en el extremo amino y aminoácidos adicionales en el extremo carboxilo.

La figura 2 ilustra una comparación de secuencias entre secuencias AhpC de *S. aureus* (SEQ ID NO: 1) y *S. epidermidis* (SEQ ID NO: 6, N.º de registro del GenBank AE016752). Las diferencias de aminoácidos se muestran en negrita.

La figura 3 ilustra una secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 5) que codifica la SEQ ID NO: 2. La etiqueta de histidina adicional y los aminoácidos en el extremo carboxilo que codifican la región se muestran en negrita.

La figura 4 ilustra una secuencia de ADN (SEQ ID NO: 4) que codifica la SEQ ID NO: 3.

Las figuras 5A y 5B ilustran una comparación de secuencias entre diferentes secuencias AhpF de *S. aureus*: SEQ ID NO: 3 (N.º de registro del GenBank U92441), 9 (N.º de registro del GenBank AP004823) y 10 (N.º de registro del GenBank BX57183) y *S. epidermidis*, SEQ ID NO: 8 (N.º de registro del GenBank AE016752). Las diferencias de aminoácidos se muestran en negrita.

Las figuras 6A y 6B ilustran resultados de experimentos usando un polipéptido de SEQ ID NO: 2 (círculos negros) en adyuvante hidroxifosfato de aluminio, o el adyuvante en solitario (triángulos).

Descripción detallada de la invención

La capacidad de polipéptidos relacionados con la SEQ ID NO: 1 de la invención para proporcionar inmunidad protectora se ilustra en los ejemplos proporcionados a continuación usando la SEQ ID NO: 2. La SEQ ID NO: 2 es un derivado de la SEQ ID NO: 1 que comprende una etiqueta de histidina en el extremo amino y tres aminoácidos adicionales en el extremo carboxilo. La etiqueta de histidina facilita la purificación e identificación de polipéptidos.

La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 se ilustra en la figura 1 mediante la región en negrita. La figura 1 también ilustra la etiqueta de histidina presente en el extremo amino y los aminoácidos adicionales en el extremo carboxilo presentes en la SEQ ID NO: 2.

I. Secuencias AhpC

AhpC de *S. aureus* se identificó inicialmente como una proteína inducida por choque osmótico que tiene una gran similitud con alquil hidropéroxido reductasas (AhpC) de *E. coli*. (Amstrong-Buisseret et al., Microbiology 141: 1655-1661, 1995.) Homólogos de AhpC de similitud variable están presentes en el cerebro de mamíferos y en diferentes organismos, incluyendo numerosas especies bacterianas. (Chae et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 91: 7017-7021, 1994, Yan et al., Helicobacter 6: 274-282, 2001.)

A las secuencias relacionadas con AhpC de *S. aureus* se les han dado diferentes designaciones en diferentes referencias. Ejemplos de diferentes designaciones se proporcionan en TIGR (SA0452); Baba et al., Lancet 359: 1819-1827, 2002 (MW0357); Kuroda et al., Lancet 357: 1225-1240, 2001 (SAV0381); y Ohta et al., DNA Research 1: 51, 2004 (SAV0381 y SAV0773).

La figura 2 proporciona una comparación de secuencias para secuencias relacionadas con AhpC de *S. aureus* presentes en *S. aureus* (SEQ ID NO: 1) y *S. epidermidis* (SEQ ID NO: 6). Pueden realizarse comparaciones adicionales a partir de otras secuencias AhpC.

Otras secuencias de AhpC de origen natural pueden identificarse basándose en la presencia de un alto grado de similitud de secuencias o aminoácidos contiguos en comparación con una secuencia AhpC conocida. Los aminoácidos contiguos proporcionan marcas características.

La similitud de secuencias puede determinarse mediante diferentes algoritmos y técnicas bien conocidas en la técnica. En general, la similitud de secuencias se determina mediante técnicas que alinean dos secuencias para obtener la máxima identidad de aminoácidos, permitiendo huecos, adiciones y sustituciones en una de las secuencias.

La similitud de secuencias puede determinarse, por ejemplo, usando una herramienta de alineamiento local que utiliza el programa lalign (desarrollado por Huang y Miller, Adv. Appl. Math. 12: 337-357, 1991, como programa «sim»). Las opciones y variables del entorno son: -f# Penalización para el primer residuo en un hueco (-14 por defecto); -g # Penalización para cada residuo adicional en un hueco (-4 por defecto)-s str (SMATRIX) el nombre de

archivo de un archivo de matriz de puntuación alternativo. Para secuencias de proteínas, se usa PAM250 por defecto-w # (LINLEN) longitud de la línea de salida para alineamientos de secuencia (60).

II. SEQ ID NO: 1 polipéptidos relacionados

5 Cada alteración de aminoácidos es independientemente una sustitución, delección o adición de aminoácidos. En diferentes realizaciones, el polipéptido relacionado con la SEQ ID NO: 1 es al menos un 99 % idéntico a la SEQ ID NO: 1; difiere de la SEQ ID NO: 1 en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 alteraciones de aminoácidos.

10 Una realización de la presente invención presente un inmunógeno polipeptídico que comprende o que consiste esencialmente en una secuencia al menos el 85 %, al menos el 95 % o el 100 % idéntica a los aminoácidos 178-189 de la SEQ ID NO: 1. En realizaciones adicionales, el polipéptido que comprende los aminoácidos 178-189 de la SEQ ID NO: 1 consiste en no más de 13, 15 o 20 aminoácidos en total. Los aminoácidos adicionales que pueden estar presentes incluyen aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 adicionales u otras regiones de aminoácidos. Un aminoácido adicional preferido es una metionina del extremo amino.

15 Pueden realizarse alteraciones a los polipéptidos de la SEQ ID NO: 1 para obtener derivados que inducen inmunidad protectora contra *S. aureus*. Pueden realizarse alteraciones, por ejemplo, para obtener un derivado que conserva la capacidad de inducir inmunidad protectora contra *S. aureus* o para obtener un derivado que, además de proporcionar inmunidad protectora, también tiene una región que puede conseguir un fin particular.

20 La comparación de secuencias proporcionada en la figura 2, y una comparación con otras secuencias AhpC de *S. aureus*, pueden usarse para guiar el diseño de potenciales alteraciones. Además, pueden realizarse alteraciones teniendo en cuenta propiedades conocidas de los aminoácidos.

25 Generalmente, al sustituir diferentes aminoácidos para conservar actividad, es preferible intercambiar aminoácidos que tienen propiedades similares. Factores que pueden ser tenidos en cuenta para una sustitución de aminoácidos incluyen el tamaño, la carga, la polaridad y la hidrofobicidad del aminoácido. El efecto de diferentes grupos R de aminoácidos sobre las propiedades del aminoácido se conoce bien en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley, 1987-2002, Apéndice 1C.)

30 Al intercambiar aminoácidos para mantener la actividad, el aminoácido de sustitución debe tener una o más propiedades similares tales como aproximadamente la misma carga y/o tamaño y/o polaridad y/o hidrofobicidad. Por ejemplo, substituir leucina por valina, lisina por arginina y glutamina por asparagina son buenos candidatos para no causar un cambio del funcionamiento del polipéptido.

35 Las alteraciones para alcanzar un fin particular incluyen aquellas diseñadas para facilitar la producción o la eficacia del polipéptido; o clonación del ácido nucleico codificado. La producción de polipéptidos puede facilitarse a través del uso de un codón de inicio (por ejemplo, que codifica metionina) adecuado para expresión recombinante. La metionina puede eliminarse más tarde durante el procesamiento celular. La clonación puede facilitarse mediante, por ejemplo, la introducción de sitios de restricción que pueden estar acompañados por adiciones o cambios de aminoácidos.

40 La eficacia de un polipéptido para inducir una respuesta inmunitaria puede mejorarse a través de mejora epitópica. La mejora epitópica puede realizarse usando diferentes técnicas tales como aquellas que implican alteración de residuos de anclaje para mejorar la afinidad peptídica por moléculas de MHC y aquellas que incrementan la afinidad del complejo péptido-MHC para un receptor de células T. (Berzofsky et al., Nature Review 1: 209-219, 2001.)

45 Preferentemente, el polipéptido es un polipéptido purificado. Un "polipéptido purificado" está presente en un entorno que carece de uno o más otros polipéptidos con los que se asocia de forma natural y/o está representado por al menos aproximadamente el 10 % de la proteína total presente. En diferentes realizaciones, el polipéptido purificado representa al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 75 %, o al menos aproximadamente el 95 % de la proteína total en una muestra o preparación.

50 En una realización, el polipéptido está "sustancialmente purificado". Un polipéptido sustancialmente purificado está presente en un entorno que carece de todos, o la mayoría, de los otros polipéptidos con los que el polipéptido está asociado de forma natural. Por ejemplo, un polipéptido de *S. aureus* sustancialmente purificado está presente en un entorno que carece de todos, o la mayoría, de los otros polipéptidos de *S. aureus*. Un entorno puede ser, por ejemplo, una muestra o preparación.

55 Referencia a "purificado" o "sustancialmente purificado" no requiere que un polipéptido experimente ninguna purificación y puede incluir, por ejemplo, un polipéptido sintetizado químicamente que no ha sido purificado.

60 La estabilidad polipeptídica puede mejorarse modificando el extremo carboxilo o el extremo amino del polipéptido. Los ejemplos de posibles modificaciones incluyen grupos protectores del extremo amino tales como acetilo, propilo, succinilo, bencilo, benciloxycarbonilo o *t*-butiloxycarbonilo; y grupos protectores del extremo carboxilo tales como

amida, metilamida y etilamida.

5 En una realización de la presente invención, el inmunógeno polipeptídico es parte de un inmunógeno que contiene una o más regiones o restos adicionales unidas covalentemente al polipéptido en el extremo carboxilo o en el extremo amino, donde cada región o resto se selecciona independientemente entre una región o resto que tiene al menos una de las siguientes propiedades: mejora la respuesta inmunitaria, facilita la purificación o facilita la estabilidad del polipéptido. La estabilidad del polipéptido puede mejorarse, por ejemplo, usando grupos tales como polietilenglicol que pueden estar presentes en el extremo amino o en el extremo carboxilo.

10 La purificación de polipéptidos puede mejorarse añadiendo un grupo al extremo carboxilo o al extremo amino para facilitar la purificación. Los ejemplos de grupos que pueden usarse para facilitar la purificación incluyen polipéptidos que proporcionan etiquetas de afinidad. Los ejemplos de etiquetas de afinidad incluyen una etiqueta de seis histidinas, trpE, glutatión y proteína de unión a maltosa.

15 La capacidad de un polipéptido de producir una respuesta inmunitaria puede mejorarse usando grupos que generalmente mejoran una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de grupos que pueden unirse a un polipéptido para mejorar una respuesta inmunitaria contra el polipéptido incluyen citoquinas tales como IL-2. (Buchan et al., 2000. Molecular Immunology 37: 545-552).

20 III. Producción de polipéptidos

25 Pueden producirse polipéptidos usando técnicas convencionales que incluyen aquellas que implican síntesis química y aquellas que implican purificación a partir de una célula que produce el polipéptido. Técnicas para síntesis química de polipéptidos se conocen bien en la técnica. (Véase por ejemplo, Vincent, Peptide and Protein Drug Delivery, Nueva York, N.Y., Decker, 1990.) Técnicas para producción y purificación de polipéptidos recombinantes también se conocen bien en la técnica. (Véase por ejemplo, Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley, 1987-2002).

30 Obtener polipéptidos a partir de una célula se facilita usando técnicas con ácido nucleico recombinante para producir el polipéptido. Las técnicas con ácido nucleico recombinante para producir un polipéptido implican introducir, o producir, un gen recombinante que codifica el polipéptido en una célula y expresar el polipéptido.

35 Un gen recombinante contiene ácido nucleico que codifica un polipéptido junto con elementos reguladores para la expresión de polipéptidos. El gen recombinante puede estar presente en un genoma celular o puede ser parte de un vector de expresión.

40 Los elementos reguladores que pueden estar presentes como parte de un gen recombinante incluyen aquellos asociados de forma natural con la secuencia que codifica el polipéptido y elementos reguladores exógenos no asociados de forma natural con la secuencia que codifica el polipéptido. Elementos reguladores exógenos tales como un promotor exógeno pueden ser útiles para expresar un gen recombinante en un huésped particular o incrementar el nivel de expresión. Generalmente, los elementos reguladores que están presentes en un gen recombinante incluyen un promotor transcripcional, un sitio de unión al ribosoma, un terminador, y un operador opcionalmente presente. Un elemento preferido para procesamiento en células eucariotas es una señal de poliadenilación.

45 La expresión de un gen recombinante en una célula se facilita a través del uso de un vector de expresión. Preferentemente, un vector de expresión además de un gen recombinante también contiene un origen de replicación para replicación autónoma en una célula huésped, un marcador seleccionable, un número limitado de sitios de enzimas de restricción útiles, y un potencial para un elevado número de copias. Los ejemplos de vectores de expresión son vectores de clonación, vectores de clonación modificados, plásmido y virus específicamente diseñados.

50 Debido a la degeneración del código genético, pueden usarse un gran número de diferentes secuencias de ácido nucleico codificantes para codificar un polipéptido particular. La degeneración del código genético surge porque casi todos los aminoácidos están codificados por diferentes combinaciones de tripletes de nucleótidos o "codones". Los aminoácidos son codificados por codones de la siguiente manera:

55
 60 A = Ala = Alanina: codones GCA, GCC, GCG, GCU
 C = Cys = Cisteína: codones UGC, UGU
 D = Asp = Ácido aspártico: codones GAC, GAU
 E = Glu = Ácido glutámico: codones GAA, GAG
 F = Phe = Fenilalanina: codones UUC, UUU
 G = Gly = Glicina: codones GGA, GGC, GGG, GGU
 H = His = Histidina: codones CAC, CAU
 65 I = Ile = Isoleucina: codones AUA, AUC, AUU
 K = Lys = Lisina: codones AAA, AAG

L = Leu = Leucina: codones UUA, UUG, CUA, CUC, CUG, CUU
 M = Met = Metionina: codón AUG
 N = Asn = Asparagina: codones AAC, AAU
 P = Pro = Prolina: codones CCA, CCC, CCG, CCU
 5 Q = Gln = Glutamina: codones CAA, CAG
 R = Arg = Arginina: codones AGA, AGG, CGA, CGC, CGG, CGU
 S = Ser = Serina: codones AGC, AGU, UCA, UCC, UCG, UCU
 T = Thr = Treonina: codones ACA, ACC, ACG, ACU
 10 V = Val = Valina: codones GUA, GUC, GUG, GUU
 W = Trp = Triptófano: codón UGG
 Y = Tyr = Tirosina: codones UAC, UAU

Las células adecuadas para la expresión de ácido nucleico recombinante de polipéptidos relacionados con la SEQ ID NO: 1 de la invención son procariotas y eucariotas. Los ejemplos de células procariotas incluyen *E. coli*; miembros del género *Staphylococcus*, tales como *S. aureus*; miembros del género *Lactobacillus*, tales como *L. plantarum*; miembros del género *Lactococcus*, tales como *L. lactis*; y miembros del género *Bacillus*, tales como *B. subtilis*. Los ejemplos de células eucariotas incluyen células de mamífero; células de insecto; células de levadura tales como miembros del género *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*), miembros del género *Pichia* (por ejemplo, *P. pastoris*), miembros del género *Hansenula* (por ejemplo, *H. polymorpha*), miembros del género *Kluyveromyces* (por ejemplo, *K. lactis* o *K. fragilis*) miembros del género *Schizosaccharomyces* (por ejemplo, *S. pombe*).

Las técnicas para producción de genes recombinantes, introducción en una célula y expresión de genes recombinantes se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de dichas técnicas se proporcionan en referencias tales como Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley, 1987-2002, y Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Si se desea, la expresión en un huésped particular se puede mejorar a través de optimización de codones. La optimización de codones incluye el uso de más codones preferidos. Técnicas para optimización de codones en diferentes huéspedes se conocen bien en la técnica.

Los polipéptidos pueden contener modificaciones postraduccionales, por ejemplo, N-glucosilación, O-glucosilación, o acetilación. La referencia a "polipéptido" o una secuencia de "aminoácidos" de un polipéptido incluye polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos que tienen una estructura de una modificación postraducciona respecta a una célula huésped, tal como un huésped de levadura.

Las modificaciones postraduccionales pueden producirse químicamente o haciendo uso de huéspedes adecuados. Por ejemplo, en *S. cerevisiae* la naturaleza del penúltimo aminoácido parece determinar si la metionina N-terminal se elimina. Además, la naturaleza del penúltimo aminoácido también determina si el aminoácido N-terminal está N^α-acetilado (Huang et al., Biochemistry 26: 8242-8246, 1987). Otro ejemplo incluye un polipéptido destinado a secreción debido a la presencia de un líder secretor (por ejemplo, péptido señal), donde la proteína se modifica mediante N- u O-glucosilación. (Kukuruzinska et al., Ann. Rev. Biochem. 56: 915-944, 1987).

IV. Adyuvantes

Los adyuvantes son sustancias que pueden ayudar a un inmunógeno a producir una respuesta inmunitaria. Los adyuvantes pueden funcionar mediante diferentes mecanismos tales como uno o más de los siguientes: incrementar la semivida biológica o inmunológica del antígeno; mejorar la administración de antígenos a células de presentación de antígenos; mejorar el procesamiento y la presentación de antígenos mediante células de presentación de antígenos; e inducir la producción de citoquinas inmunomoduladoras. (Vogel, Clinical Infectious Diseases 30 (supl. 3): S266-270, 2000).

Diversos tipos diferentes de adyuvantes pueden emplearse para ayudar en la producción de una respuesta inmunitaria. Los ejemplos de adyuvantes particulares incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, u otras sales de aluminio, fosfato de calcio, motivos CpG de ADN, monofosforil lípido A, toxina del cólera, toxina de *E. coli* termolábil, toxina de pertussis, muramil dipéptido, adyuvante incompleto de Freund, MF59, SAF, complejos inmunoestimuladores, liposomas, microesferas biodegradables, saponinas, copolímeros de bloque no iónicos, análogos de péptido de muramilo, polifosfaceno, polinucleótidos sintéticos, IFN- γ , IL-2, IL-12 e ISCOMS. (Vogel Clinical Infectious Diseases 30 (supl 3): S266-270, 2000, Klein et al., Journal of Pharmaceutical Sciences 89: 311-321, 2000, Rimmelzwaan et al., Vaccine 19: 1180-1187, 2001, Kersten Vaccine 21: 915-920, 2003, O'Hagen Curr. Drug Target Infect. Disord., 1: 273-286, 2001).

V. Pacientes

Un "paciente" se refiere a un mamífero capaz de ser infectado por *S. aureus*. Un paciente puede ser tratado profiláctica o terapéuticamente. El tratamiento profiláctico proporciona suficiente inmunidad protectora para reducir la

probabilidad o gravedad, de una infección por *S. aureus*. El tratamiento terapéutico puede realizarse para reducir la gravedad de una infección por *S. aureus*.

5 El tratamiento profiláctico puede realizarse usando una vacuna que comprende un inmunógeno descrito en el presente documento. Dicho tratamiento se realiza, preferentemente, en un ser humano. Pueden administrarse vacunas a la población general o a aquellas personas en un riesgo incrementado de infección por *S. aureus*.

10 Personas con un riesgo incrementado de infección por *S. aureus* incluyen trabajadores de atención sanitaria; pacientes de hospital; pacientes con un sistema inmunitario debilitado; pacientes que se someten a cirugía; pacientes que reciben implantes de cuerpos extraños, tales como un catéter o un dispositivo vascular; pacientes que afrontan terapia que causa una inmunidad debilitada; y personas en profesiones que tienen un riesgo incrementado de lesión por quemaduras o heridas. (The Staphylococci in Human Disease, Crossley and Archer (ed.), Churchill Livingstone Inc. 1997.)

15 Los pacientes no humanos que pueden ser infectados por *S. aureus* incluyen vacas, cerdos, ovejas, cabras, conejos, caballos, perros, gatos, monos, ratas y ratones. El tratamiento de pacientes no humanos es útil para proteger mascotas y ganado, y para evaluar la eficacia de un tratamiento particular.

20 VI. Vacunas de combinación

Los inmunógenos descritos en el presente documento pueden usarse en solitario, o en combinación con otros inmunógenos, para inducir una respuesta inmunitaria. Inmunógenos adicionales que pueden estar presentes incluyen: uno o más inmunógenos de *S. aureus* adicionales, tales como los mencionados en los Antecedentes de la invención *supra*; uno o más inmunógenos dirigidos a uno o más organismos de *Staphylococcus* diferentes tales como *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, o *S. lugunensis*; y uno o más inmunógenos dirigidos a otros organismos infecciosos.

30 VII. Sistema de modelo animal

Un sistema de modelo animal se usó para evaluar la eficacia de un inmunógeno para producir una respuesta inmunitaria protectora contra *S. aureus*. El modelo animal era un modelo de letalidad de cinética lenta que implica *S. aureus* preparado a partir de células en fase estacionaria, valorado de forma cuantitativa apropiadamente y administrado por vía intravenosa. Esta cinética de muerte lenta proporciona suficiente tiempo para que la defensa inmunitaria específica combata la infección bacteriana (por ejemplo, 10 días en lugar de 24 horas).

35 Las células de *S. aureus* en fase estacionaria pueden obtenerse de células cultivadas en medio sólido. También pueden obtenerse a partir de líquido, sin embargo los resultados con células cultivadas en medio sólido eran más reproducibles. Las células pueden cultivarse convenientemente durante una noche en medio sólido. Por ejemplo, *S. aureus* puede cultivarse de aproximadamente 18 a aproximadamente 24 horas en condiciones donde el tiempo de duplicación es de aproximadamente 20-30 minutos.

40 *S. aureus* puede aislarse a partir de medio sólido o líquido usando técnicas convencionales para mantener la potencia de *S. aureus*. El *S. aureus* aislado puede almacenarse, por ejemplo, a -70 °C como una suspensión de alta densidad levada ($> 10^9$ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml) en solución salina tamponada con fosfato que contiene glicerol.

45 La exposición con *S. aureus* debe tener una potencia que proporcione aproximadamente del 80 al 90 % de muertes en un modelo animal durante un periodo de aproximadamente 7 a 10 días comenzando en el primer o el segundo día. Pueden realizarse experimentos de valoración cuantitativa usando modelos animales para monitorizar la potencia del inóculo de *S. aureus* almacenado. Los experimentos de valoración cuantitativa pueden realizarse a partir de una a dos semanas antes de un experimento de inoculación.

50 VIII. Anticuerpos

55 Pueden usarse inmunógenos que contienen polipéptidos relacionados con la SEQ ID NO: 1 y composiciones de AhpC-AhpF para producir proteínas de unión aisladas que se unen al inmunógeno o a *S. aureus*. Dichas proteínas de unión tienen diferentes usos incluyendo uso en purificación de polipéptidos, la identificación de *S. aureus*, o en tratamiento terapéutico o profiláctico contra infección por *S. aureus*. Preferentemente, la proteína de unión está sustancialmente libre de proteínas del suero.

60 Una proteína de unión comprende una primera región variable y una segunda región variable. Las regiones variables tienen la estructura de una región variable de anticuerpo de una cadena pesada o ligera. Las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos contienen tres regiones determinantes de la complementariedad con espacio intermedio en un marco. Las regiones determinantes de la complementariedad son principalmente responsables de reconocer un epítipo particular. Los ejemplos de proteína de unión al anticuerpo incluyen anticuerpos monocatenarios, un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo y derivados de los mismos.

Una proteína de unión al antígeno preferida es un anticuerpo monoclonal. La referencia a un “anticuerpo monoclonal” indica una colección de anticuerpos que tienen la misma, o sustancialmente la misma, región determinante de la complementariedad y especificidad de unión. La variación en los anticuerpos monoclonales es la que se produciría si los anticuerpos fueran producidos a partir de la misma una o varias construcciones.

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse, por ejemplo, a partir de un hibridoma particular y a partir de una célula recombinante que contiene uno o más genes recombinantes que codifican el anticuerpo. El anticuerpo puede estar codificado por más de un gen recombinante donde, por ejemplo, un gen codifica la cadena pesada y un gen codifica la cadena ligera.

Los fragmentos de anticuerpo que contienen una región variable de anticuerpo incluyen regiones Fv, Fab y Fab₂. Cada región Fab contiene una cadena ligera compuesta por una región variable y una región constante, y una región de cadena pesada que contiene una región variable y una región constante. Una cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante formación de puentes disulfuro a través de regiones constantes. Las regiones variables de cadena ligera y pesada de una región Fab proporcionan una región Fv que participa en unión a antígenos.

La región variable de anticuerpo también puede ser parte de regiones variables que contienen proteína tales como anticuerpo monocatenario y un minicuerpo. Un anticuerpo monocatenario contiene una región variable ligera y una pesada unidas entre sí por un enlazador. El enlazador puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5 a 16 aminoácidos. Un minicuerpo es una proteína de fusión de CH3 monocatenaria que se autoensambla en un dímero bivalente de aproximadamente 80 kDa.

La especificidad de la región variable es determinada por tres regiones hipervariables (también denominadas regiones determinantes de la complementariedad), que están interpuestas entre regiones flanqueantes más conservadas (también llamadas regiones marco). Los aminoácidos asociados con regiones marco y regiones determinantes de la complementariedad puede numerarse y alinearse tal como se describe por Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, 1991.

Las técnicas para generar una proteína de unión al antígeno tal como un anticuerpo monocatenario, un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo se conocen bien en la técnica. Los ejemplos de dichas técnicas incluyen el uso de tecnología de presentación en fagos, identificación y humanización de anticuerpos de roedor, y generación de anticuerpos humanos usando un ratón XenoMouse o Trans-Chromo. (Por ejemplo, Azzazy et al., *Clinical Biochemistry* 35: 425-445, 2002, Berger et al., *Am. J. Med. Sci.* 324(1): 14-40, 2002).

Anticuerpos murinos pueden humanizarse, y CDR, pueden injertarse en marcos de anticuerpo humano usando técnicas bien conocidas en la técnica. Dichas técnicas se describen generalmente con referencia a humanizar anticuerpos murinos injertando regiones variables murinas en un marco de anticuerpo humano y, si fuera necesario realizar modificaciones adicionales. (Por ejemplo, O'Brien et al., *Humanization of Monoclonal Antibodies by CDR Grafting*, p. 81-100, de *Methods in Molecular Biology Vol 207: Recombinant antibodies for Cancer Therapy: Methods and Protocols* (Eds. Welschof and Krauss) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, 2003).

Proteínas de unión al antígeno se producen preferentemente usando técnicas de ácido nucleico recombinante o a través del uso de un hibridoma. Las técnicas de ácido nucleico recombinante implican construir una plantilla de ácido nucleico para la síntesis de proteínas. Un hibridoma es una línea celular inmortalizada que produce la proteína de unión al antígeno.

Ácido nucleico recombinante que codifica una proteína de unión al antígeno puede expresarse en una célula huésped que, en efecto, sirve como fábrica para la proteína codificada. El ácido nucleico recombinante puede proporcionar un gen recombinante que codifica la proteína de unión al antígeno que existe de forma autónoma a partir del genoma de una célula huésped o como parte del genoma de la célula huésped.

Un gen recombinante contiene ácido nucleico que codifica una proteína junto con elementos reguladores para la expresión de proteínas. Generalmente, los elementos reguladores que están presentes en un gen recombinante incluyen un promotor transcripcional, un sitio de unión al ribosoma, un terminador, y un operador opcionalmente presente. Un elemento preferido para procesamiento en células eucariotas es una señal de poliadenilación. También pueden estar presentes intrones asociados a anticuerpos. Los ejemplos de casetes de expresión para producción de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se conocen bien en la técnica. (Por ejemplo, Persic et al., *Gene* 187: 9-18, 1997, Boel et al., *J. Immunol. Methods* 239: 153-166, 2000, Liang et al., *J. Immunol. Methods* 247: 119-130, 2001).

La expresión de un gen recombinante en una célula se facilita usando un vector de expresión. Preferentemente, un vector de expresión, además de un gen recombinante, también contiene un origen de replicación para replicación autónoma en una célula huésped, un marcador seleccionable, un número limitado de sitios de enzima de restricción útiles, y un potencial para un elevado número de copias. Los ejemplos de vectores de expresión para la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo se conocen bien en la técnica. (Por ejemplo, Persic et al., *Gene* 187: 9-18, 1997, Boel et al., *J. Immunol. Methods* 239: 153-166, 2000, Liang et al., *J. Immunol. Methods* 247: 119-130,

2001.)

Si se desea, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo puede estar integrado en el cromosoma huésped usando técnicas bien conocidas en la técnica. (Véase, Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley, 1987-1998, Mark et al., patente de Estados Unidos N.º 6.743.622).

Pueden usarse diversas líneas celulares diferentes para expresión de proteínas de unión al antígeno recombinante, incluyendo aquellas de organismos procariotas (por ejemplo, *E. coli*, Bacilos y *Streptomyces*) y de eucariotas (por ejemplo, levadura, Baculovirus y mamíferos). (Breitling et al., Recombinant Antibodies, John Wiley & Sons, Inc. y Spektrum Akademischer Verlag, 1999).

Los huéspedes preferidos para expresión de proteínas de unión al antígeno recombinantes son células de mamífero capaces de producir proteínas de unión al antígeno con modificaciones postraduccionales apropiadas. Las modificaciones postraduccionales incluyen la formación y glucosilación de puentes disulfuro. Otro tipo de modificación postraduccionales es escisión de péptido señal.

La glucosilación apropiada puede ser importante para la función de un anticuerpo. (Yoo et al., Journal of Immunological Methods 261: 1-20, 2002). Los anticuerpos de origen natural contienen al menos un carbohidrato enlazado a N fijado a una cadena pesada. (*Id.*) Carbohidratos enlazados a N y carbohidratos enlazados a O adicionales pueden estar presentes y pueden ser importantes para la función de anticuerpos. (*Id.*)

Pueden usarse diferentes tipos de células huésped de mamífero para proporcionar modificaciones postraduccionales eficaces. Los ejemplos de dichas células huésped incluyen ovario de hámster chino (CHO), HeLa, C6, PC 12, y células de mieloma. (Yoo et al., Journal of Immunological Methods 261: 1-20, 2002, Persic et al., Gene 187: 9-18, 1997).

Un hibridoma puede producirse usando técnicas tales como las descritas en Ausubel Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley, 1987-1998, Harlow et al., Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, y Kohler et al., Nature 256, 495-497, 1975.

IX. Administración

Inmunógenos y proteínas de unión pueden formularse y administrarse a un paciente usando las directrices proporcionadas en el presente documento junto con técnicas bien conocidas en la técnica. Las directrices para administración farmacéutica en general se proporcionan en, por ejemplo, Vaccines Eds. Plotkin and Orenstein, W.B. Sanders Company, 1999; Remington's Pharmaceutical Sciences 20ª Edición; y Modern Pharmaceutics 2ª Edición, Eds. Banker and Rhodes, Marcel Dekker, Inc., 1990, cada uno de los cuales se incorpora por el presente como referencia en el presente documento.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables facilitan el almacenamiento y la administración de un inmunógeno a un paciente. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden contener diferentes componentes tales como un tampón, agua estéril para inyección, solución salina normal o solución salina tamponada con fosfato, sacarosa, histidina, sales y polisorbato.

Los inmunógenos y la proteína de unión pueden administrarse mediante diferentes vías tales como subcutánea, intramuscular o mucosal. La administración subcutánea e intramuscular puede realizarse usando, por ejemplo, agujas o inyectores de chorro.

Los regímenes de dosificación adecuados se determinan preferentemente teniendo en cuenta factores bien conocidos en la técnica que incluyen edad, peso, sexo y condición médica del paciente; la vía de administración; el efecto deseado; y el compuesto particular empleado. El inmunógeno o la proteína de unión pueden usarse en formatos multidosis. Se espera que una dosis consistiría en el intervalo de 1,0 µg a 1,0 mg de polipéptido total, en diferentes realizaciones de la presente invención el intervalo es de 0,01 mg a 1,0 mg y de 0,1 mg a 1,0 mg.

El momento de administración de las dosis depended de factores bien conocidos en la técnica. Después de la administración inicial, una o más dosis de refuerzo pueden administrarse posteriormente para mantener o reforzar los valores cuantitativos de anticuerpos. Un ejemplo de un régimen de dosificación sería del día 1, 1 mes, una tercera dosis a 4, 6 o 12 meses, y dosis de refuerzo adicionales en momentos distantes, tal como sea necesario.

EJEMPLOS

A continuación, se proporcionan ejemplos que ilustran adicionalmente diferentes características de la presente invención. Los ejemplos también ilustran metodología útil para poner en práctica la invención. Estos ejemplos no limitan la invención reivindicada.

Ejemplo 1: Inmunidad protectora

Este ejemplo ilustra la capacidad de polipéptidos relacionados con la SEQ ID NO: 1 de proporcionar inmunidad protectora en un modelo animal. La SEQ ID NO: 2, un derivado marcado con His de la SEQ ID NO: 1, se usó para proporcionar inmunidad protectora.

Clonación y expresión de la SEQ ID NO: 2

La proteína codificada por COL SA0452 se diseñó para ser expresada a partir del vector pET16b (EMD Biosciences, Madison, WI) con los residuos de histidina N-terminales y el codón de terminación codificado por el vector. También codificados por el vector están nueve aminoácidos adicionales después de la etiqueta de histidina y tres aminoácidos adicionales en el extremo carboxilo. Se diseñaron cebadores de PCR para amplificar COL SA0452 comenzando en el primer codón de serina y terminando antes del codón de terminación y el residuo de isoleucina terminal. Los cebadores directo e inverso fueron: 5'GGGAATTCCATATGTCATTAATTAACAAAGAAATCTTACC3' (SEQ ID NO: 7) y 5'GGGCTCAGCGATTTTACCTACTAAATCTAAACCAG3' (SEQ ID NO: 11), respectivamente y contenían sitios de restricción adicionales (subrayados), *es decir*, *NdeI* (cebador directo) y *Bpu11 0211* (cebador inverso) y una pinza GC para facilitar la clonación en el vector de expresión.

Se purificó ADN genómico a partir de la cepa COL MB5393 de *S. aureus* y se usó como plantilla para PCR. Se cultivó un cultivo de 50 ml durante una noche en caldo Difco Tryptic Soy Broth (Becton Dickinson, Sparks, MD) a 37 °C y las células se recogieron por centrifugado. Las células se lavaron una vez en 5 ml de Tris 10 mM pH 7,5, sacarosa al 25 % y se resuspendieron en la misma solución que contenía 50 µg/ml de lisostafina (Sigma, St. Louis, MO). La mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora y posteriormente, se añadieron 2,5 ml de EDTA 0,25 M pH 8,0. Después de incubación durante 15 minutos en hielo, se añadieron 7,5 ml de Sarkosyl al 2 % y la mezcla se agitó suavemente y se le dejó reposar durante 30 minutos más en hielo. Se añadieron ciento cincuenta µl de ARNasa, 5 mg/ml en acetato sódico 0,1 M, y la mezcla se incubó durante una hora a 37 °C. A continuación, se añadieron 0,6 ml de proteinasa K, 25 mg/ml, y la incubación continuó durante 2 horas seguida por una incubación durante una noche a 4 °C. El lisado se extrajo con 15 ml de fenol saturado en agua mediante rotación suave durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para separar las fases, la mezcla se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. La fase acuosa se recogió y la extracción con fenol se repitió dos veces más. A continuación, la fase acuosa se extrajo diez veces con un volumen igual se cloroformo. Después de la última extracción, la fase acuosa se recogió, el volumen se midió y se añadió medio volumen de acetato de amonio 7,5 M.

El ADN se precipitó añadiendo dos volúmenes de etanol al 100 % y se recogió enrollando con una barra de vidrio. El ADN se disolvió en 5,0 ml de TE que contenía 4 µl de pirocarbonato de dietilo durante una noche a 4 °C. Las precipitaciones con etanol se repitieron dos veces más.

El gen *ahpC* se amplificó por PCR en un volumen de reacción de 50 µl preparado por duplicado. Cada uno contenía 250 ng de ADN genómico, 125 ng de cada cebador directo e inverso, 1 microlitro de dNTP 10 mM, 2,5 unidades de Pfu polimerasa nativa y 1X tampón Pfu (Stratagene, La Jolla CA). Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: un ciclo de 94 °C durante 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C durante 45 segundos, 56 °C durante 45 segundos, 72 °C durante un minuto; un ciclo de 72 °C durante 10 minutos. La secuencia de ADN amplificada (584 pb) se dirigió con las enzimas de restricción apropiadas y se purificó en gel usando Gene Clean II® (QBIogene, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN se ligó en el vector pET16b usando los sitios *NdeI*/*Bpu11021* que habían sido insertados en los cebadores de PCR y se introdujeron en células competentes NovaBlue de *E. coli* (EMD Biosciences).

La mezcla de transformación se cultivó durante una noche a 37 °C en placas de agar Lennox L Broth bajo en sal que contenían 100 µg/ml cada una de ampicilina, IPTG, y X-gal, preparados usando agar imMedia™ Amp (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron y se cultivaron colonias en caldo Luria Broth (LB) con 50 µg/ml de ampicilina, se realizaron minipreparaciones de ADN (Promega), y el inserto apropiado se determinó mediante digestión con endonucleasa de restricción. El ADN plasmídico de dos minipreparaciones se secuenció, y un clon que no contenía cambios de ADN a partir de la secuencia deseada se seleccionó y se designó pAhpC5.

Células competentes de *E. coli* BLR (DE3) (EMD Biosciences) se transformaron con pAhpC5 y se cultivaron en placas de LB que contenían ampicilina (100 µg/ml). Para ensayar la expresión de *ahpC*, se inoculó una colonia aislada en 5 ml de LB líquido (ampicilina) y se incubaron a 37 °C, 220 rpm durante 6 horas. El cultivo se mantuvo durante una noche a 4 °C y se inoculó el día siguiente en 20,0 ml de caldo LB (ampicilina) de modo que la DO₆₀₀ de partida igualaba 0,02. El cultivo se incubó a 37 °C, 220 rpm durante cuatro horas a una DO₆₀₀ = 0,8. La inducción de expresión se comparó a tres temperaturas diferentes. Se añadieron cuarenta y cinco microlitros de IPTG 100 mM a tres volúmenes de cultivo de 4,5 ml (concentración de IPTG final de 1 mM) y se incubaron a 37 °C durante 3 horas, y 25 °C o 18 °C durante 24 horas, como con agitación a 220 rpm. Para la preparación del lisado, 1,5 ml y 1,0 ml de

volumen de cultivo de cultivos sin inducir e inducidos, respectivamente, se recogieron por centrifugado y se resuspendieron en 300 μ l de BugBuster HT (EMD Sciences) y 3 μ l de cóctel inhibidor de Proteinasa (Sigma, St. Louis, MO). Las mezclas se mantuvieron en hielo durante 5 minutos y posteriormente se sonicaron tres veces durante diez segundos cada una con refrigeración entre ellas. Para obtener fracciones "solubles" e "insolubles" la mezcla se centrifugó a 14.000 rpm durante cinco minutos a 4 °C. El sobrenadante se designó "soluble" y el sedimento se resuspendió en 300 μ l de BugBuster HT y 3 μ l de cóctel inhibidor de Proteinasa y se designó "insoluble". La concentración de proteínas se determinó mediante el sistema Protein Assay Dye Reagent de BIO-RAD (BIO-RAD, Hercules, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para el análisis de la expresión de ahpC (codificado por SEQ ID NO: 3) mediante tinción con Coomassie de geles de SDS-PAGE, las muestras se sometieron a electroforesis en geles Criterion de Tris-HCl a un gradiente del 4-15 % (BIO-RAD) en 1X tampón Tris glicina SDS (BIO-RAD) en condiciones reductoras y desnaturizantes. Para estimar tamaño de la proteína, estándares entre 15 y 250 kDa (BIO-RAD) se hicieron desplazar en paralelo con los lisados. Los geles se tiñeron con Bio-Safe Coomassie, un colorante Coomassie G250 (BIO-RAD) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Una proteína de 24 kDa se detectó específicamente en lisados preparados a partir de muestras inducidas a las tres temperaturas. Se obtuvo una buena expresión a las tres temperaturas con localización de ahpC en la fracción tanto soluble como insoluble. La inducción a 25 °C era la temperatura óptima para producir ahpC soluble.

Purificación de la SEQ ID NO: 2

Se consiguió el aumento a escala directo del procedimiento a pequeña escala en fermentadores en tanque agitado (escala de 30 litros) con un volumen de trabajo de 20 litros. El inóculo se cultivó en un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de medio Luria-Bertani (LB) (más ampicilina) y se inoculó con 1 ml de cultivo de siembra congelado y se cultivó durante 6 horas. Un ml de esta siembra se usó para inocular un matraz de 2 litros que contenía 500 ml de medio LB (más ampicilina) y se incubó durante 16 horas. Un fermentador a gran escala (escala de 30 litros) se cultivó con 20 litros de medio LB (más ampicilina). Los parámetros de fermentación del fermentador fueron: presión = 5 psig, velocidad de agitación = 300 rpm, flujo de aire = 7,5 litros/minuto y temperatura = 37 °C. Las células se incubaron a una densidad óptica (DO) de 1,3 unidades de densidad óptica, a una longitud de onda de 600 nm, y se indujeron con Isopropil- β -K-Tiogalactósido (IPTG) a una concentración de 1 mM. El tiempo de inducción con IPTG fue de dos horas. Las células se recogieron rebajando la temperatura a 15 °C, se concentraron mediante paso a través de un cartucho de fibra hueca 500KMWCO, y se centrifugaron a 8.000 veces la gravedad a 4 °C durante 20 minutos. Los sobrenadantes se decantaron y los sedimentos de células húmedas de *E. coli* recombinantes se congelaron a -70 °C.

Pasta de células de *E. coli* recombinantes congeladas (24 gramos) se descongeló y se resuspendió en dos volúmenes de tampón de lisis (50 mM de fosfato sódico, pH 8,0, NaCl 0,15 M, cloruro de magnesio 2 mM, imidazol 10 mM, 2-mercaptoetanol 20 mM, Tween-80 al 0,1 %, y cóctel inhibidor de proteasa (Complete™, libre de EDTA, Roche # 1873580-un comprimido por 50 ml de tampón de lisis). Se añadió benzonasa (EM #1.01697.0002) a la suspensión celular a 125 Unidades/ml). Se preparó un lisado con un microfluidizador. El lisado se agitó durante tres horas a 4 °C, y se clarificó mediante centrifugado a 10.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de un prefiltro de fibra de vidrio de Millipore y se añadió NaCl a una concentración final de 0,5 M a partir de una solución madre 5 M. El sobrenadante filtrado se añadió a resina de cromatografía Ni-NTA agarosa (Qiagen #30250) y la pasta semilíquida se mezcló durante una noche a 4 °C. La pasta semilíquida de resina de cromatografía se vertió en una columna de cromatografía y la fracción no unida se recogió por gravedad a partir de la salida de la columna. La columna se lavó con diez volúmenes de columna de tampón de lavado (fosfato sódico 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,5 M, cloruro de magnesio 2 mM, imidazol 10 mM, 2-mercaptoetanol 20 mM, Tween-80 al 0,1 %, y cóctel inhibidor de proteasa (Complete™, libre de EDTA, Roche # 1873580 un comprimido por 50 ml de tampón de lavado). La columna se eluyó con tampón de elución (fosfato sódico 50 mM, pH 7,4, imidazol 0,3 M, cloruro de magnesio 2 mM, Tween-80 al 0,1 %, y 2-mercaptoetanol 20 mM). Se identificaron fracciones que contenían proteína mediante transferencia en mancha en membrana de nitrocelulosa con tinción de Ponceau-S, y fracciones que contenían las concentraciones más elevadas de proteína se reunieron para preparar el producto Ni-IMAC. El producto Ni-IMAC se fraccionaron mediante SEC. Las fracciones de SEC que contenían la proteína producto se identificaron mediante SDS/PAGE con tinción de Coomassie. Las fracciones de SEC que contenían producto se reunieron para preparar el producto de SEC. El producto de SEC se filtró de forma estéril y se adsorbió sobre adyuvante de hidroxifosfato de aluminio a una concentración final de 0,2 mg/ml.

Preparación de exposición con *S. aureus*

Se cultivó *S. aureus* en placas de TSA a 37 °C durante una noche. Las bacterias se lavaron de las placas de TSA añadiendo 5 ml de PBS a una placa y resuspendiendo suavemente las bacterias con un esparcidor estéril. La suspensión bacteriana se agitó a 6000 rpm durante 20 minutos usando una centrífuga Sorvall RC-5B (DuPont Instruments). El sedimento se resuspendió en glicerol al 16 % y se almacenaron alícuotas congeladas a -70 °C.

Antes del uso, se descongelaron los inóculos, se diluyeron apropiadamente y se usaron para infección. Cada

solución madre se valoró cuantitativamente al menos 3 veces para determinar la dosis apropiada que induce cinética lenta de muerte en ratones sin exposición previa. La potencia del inóculo bacteriano (letalidad del 80 al 90 %) se monitorizó constantemente para garantizar la reproducibilidad del modelo. Diez días antes de cada experimento de exposición, un grupo de 10 animales de control (inmunizados con adyuvante en solitario) se provocaron y se monitorizaron.

Estudios de protección para un polipéptido de la SEQ ID NO: 2

En dos experimentos independientes, veinte ratones BALB/c se inmunizaron, cada uno, con tres dosis de polipéptido de la SEQ ID NO: 2 (20 µg por inyección) en adyuvante hidroxifosfato de aluminio (450 µg por inyección), y a 20 ratones se les inyectó, a cada uno, adyuvante de hidroxifosfato de aluminio (450 µg por inyección). El adyuvante de hidroxifosfato de aluminio (AHP) se describe por Klein et al., Journal of Pharmaceutical Sciences 89: 311-321, 2000. Los materiales se administraron como dos inyecciones intramusculares de 50 µl los días 0, 7 y 21. Se extrajo sangre a los ratones el día 28, y sus sueros se cribaron mediante ELISA para reactividad a la SEQ ID NO: 2.

El día 35 de cada experimento, los ratones se provocaron mediante inyección intravenosa de *S. aureus* (dosis 7 X 10⁸ UFC/ml). Los ratones se monitorizaron durante un periodo de 11 días para supervivencia. Al final del primer experimento 12 ratones sobrevivieron en el grupo inmunizado con el polipéptido de la SEQ ID NO: 2, en comparación con 5 que sobrevivieron en el grupo de control de AHP. Los resultados se ilustran en la figura 6A. En el segundo experimento, 11 ratones sobrevivieron en el grupo inmunizado con el polipéptido de la SEQ ID NO: 2, en comparación con 7 que sobrevivieron en el grupo de control de AHP. Los resultados se ilustran en la figura 6B.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Merck & Co., Inc.

<120> POLIPÉPTIDOS PARA INDUCIR UNA RESPUESTA INMUNITARIA PROTECTORA CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

<130> 21722 PCT

<150> 60/645.811

<151> 21-01-2005

<160> 11

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 189

<212> PRT

<213> *S. aureus*

<400> 1

ES 2 589 927 T3

```

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

```

<210> 2
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Derivado etiquetado con His de SEQ ID NO: 1

10

<400> 2

```

Met Gly His Ser Ser Gly His
 1      5      10      15

```

ES 2 589 927 T3

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

<210> 3
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> *S. aureus*
 <400> 3

5

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

10

ES 2 589 927 T3

210						215						220					
Ala	Arg	Lys	Gly	Leu	Arg	Thr	Gly	Ile	Val	Ala	Asp	Arg	Ile	Gly	Gly		
225					230					235					240		
Gln	Val	Asn	Asp	Thr	Ala	Gly	Ile	Glu	Asn	Phe	Ile	Thr	Val	Lys	Glu		
				245					250					255			
Thr	Thr	Gly	Ser	Glu	Phe	Ser	Ser	Asn	Leu	Ala	Ala	His	Ile	Asp	Gln		
			260					265					270				
Tyr	Asp	Ile	Asp	Ala	Met	Thr	Gly	Ile	Arg	Ala	Thr	Asp	Ile	Glu	Lys		
			275				280					285					
Thr	Asp	Glu	Ala	Ile	Lys	Val	Thr	Leu	Glu	Asn	Gly	Ala	Val	Leu	Glu		
	290					295					300						
Ser	Lys	Thr	Val	Ile	Ile	Ala	Thr	Gly	Ala	Gly	Trp	Arg	Lys	Leu	Asn		
305					310					315					320		
Ile	Pro	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu	Ile	Asn	Lys	Gly	Val	Ala	Phe	Cys	Pro		
				325					330					335			
His	Cys	Asp	Gly	Pro	Leu	Phe	Glu	Asn	Lys	Asp	Val	Ala	Val	Ile	Gly		
			340					345					350				
Gly	Gly	Asn	Ser	Gly	Val	Glu	Ala	Ala	Ile	Asp	Leu	Ala	Gly	Ile	Val		
		355					360					365					
Asn	His	Val	Thr	Leu	Phe	Glu	Phe	Ala	Ser	Glu	Leu	Lys	Ala	Asp	Asn		
	370					375					380						
Val	Leu	Gln	Asp	Arg	Leu	Arg	Ser	Leu	Ser	Asn	Val	Asp	Ile	Lys	Thr		
385					390					395					400		
Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Glu	Val	Val	Gly	Glu	Asp	His	Val	Thr	Gly	Ile		
				405					410					415			
Arg	Tyr	Glu	Asp	Met	Asn	Thr	Gly	Glu	Glu	His	Leu	Leu	Asn	Leu	Asp		
			420					425						430			
Gly	Ile	Phe	Val	Gln	Ile	Gly	Leu	Leu	Pro	Asn	Thr	Ser	Trp	Leu	Asn		
		435					440					445					
Asp	Ala	Val	Glu	Leu	Asn	Glu	Arg	Gly	Glu	Ile	Val	Ile	Asp	Arg	Asn		
	450					455					460						
Asn	Asn	Thr	Asn	Val	Pro	Gly	Ile	Phe	Ala	Ala	Gly	Asp	Val	Thr	Asp		
465					470					475					480		
Gln	Lys	Asn	Lys	Gln	Ile	Ile	Ile	Ser	Met	Gly	Ala	Gly	Ala	Asn	Ala		
				485					490					495			
Ala	Leu	Asn	Ala	Phe	Asp	Tyr	Ile	Ile	Arg	Asn							
		500						505									

<210> 4
 <211> 1521
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de ADN que codifica la SEQ ID NO: 3

10

<400> 4

```

atgcttaatg ctgatttaaa acaacaactt aaacaactat tagaactaat ggagggaac 60
gttgaattcg ttgccagcct tggttcagat gataaatcca aagaacttaa agatttggtg 120
acagaaatta ctgatatgtc acctagacta tctctttctg aaaaatcttt aaaacgtaca 180
ccaagtttct cagtcaatcg tcttggcgaa gaaacaggtg taacatttgc aggtattcca 240
ttaggtcacg agtttaactc acttgtttta gcaattttac aggttagtgg tcgtgcacct 300
aaagaaaaac agtcaatcat tgacaaaatt aaaaaattag aaggttcatt ccattttgaa 360
acattcatta gtttaacgtg tcaaaaaatgt cctgatgtcg ttcaagcact taacttaatg 420
agtgtgatca accctaacat caccgattct atgattgatg gtgcagtggt cegtgaagaa 480
tctgaaaaca tcatggcagt ccctgctgtc tttttaaag gccaagaatt tggcaatggt 540
cgtatgacaa tccaagatat tctttcgaaa ctaggcagta cggcagatgc atctgagttt 600
gaaaataaag aaccttatga tgtcttaatc gttgggtggt gtctctgctag tggtagtgca 660
gcgatttaca cagcacgtaa aggtttacgt actggtatag ttgctgatcg tatcggtggc 720
caagttaatg atactgctgg tattgagaac ttcattactg ttaaagaaac aactggttct 780
    
```

ES 2 589 927 T3

```

gaattttctt ctaacttagc agcgcacatt gatcaaatg acattgatgc aatgacaggt 840
atacgtgcta cagatatcga aaagactgac gaagcaatta aagttacggt agaaaacggt 900
gctgtcttag aaagtaaaac agtcattatt gctactgggt caggttggcg taagctaaac 960
attccagggt aagagcaatt gattaataaa ggtgttgcac tctgccctca ctgtgacgga 1020
cctctatctg aaaataaaga cgtagcagtt atcgggtggcg gtaactctgg gggtgaagca 1080
gcaattgacc ttgctggtat cgttaatcat gttacattat tcgaattcgc tagcgaatta 1140
aaagcagaca acgtgttaca agatcgttta cgttctttat caaatggtga tatcaaaaaca 1200
aatgccaaaa ctactgaagt tgcgcgagaa gaccatgta caggtatagc ttacgaagac 1260
atgaacaccg gcgaagaaca tctacttaac ttagatggta tctttgttca aattggttta 1320
cttccaaaaca catcatgggt aaacgatgct gttgaattaa acgaacgtgg tgaaattgtg 1380
attgatcgta acaataatac gaatgttcct ggaatatttg ctgctggcga tgtcacagat 1440
cagaagaaca acaaaattat catttcaatg ggcgctgggt caaatgcagc attaaatgcc 1500
tttgactata ttatcagaaa c 1521

```

5 <210> 5
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 2
 <400> 5

```

atggggccatc atcatcatca tcatcatcat catcacagca ggggccatat cgaaggctcgt 60
catatgtcat taattaacaa agaaatctta ccatttacag cgcaagcttt cgatecaaaa 120
aaagatcaat ttaaagaagt tacacaagaa gatttaaag gttcttggag cgtagtatgc 180
ttctatcctg ctgacttctc attcgtttgt ccaactgaat tagaagactt acaaaaccaa 240
tatgaagaat tacaaaaatt aggcgtaaat gtattctcag tatcaactga tactcacttc 300
gtacacaaaag catggcatga ccattcagat gcaattagca aaatcactta cactatgatt 360
ggtgacccat cacaaaacaat cactcgtaat tttgatgtat tagatgaagc tactggttta 420
gctcaacgtg gtacattcat tatcgaccca gacggtgttg tacaagcacc tgaaattaac 480
gctgacggaa ttggccgtga cgctagtaca ttagctcaca aaatcaaagc agctcaatat 540
gttcgtaaaa accctggcga agtatgcccc gctaaatggg aagaaggcgc taaaacattg 600
caacctgggt tagatttagt aggtaaaaac gctgagcaat aa 642

```

15 <210> 6
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> *S. epidermidis*

20 <400> 6

ES 2 589 927 T3

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

5 <210> 7
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Cebador PCR

<400> 7
 gggaattcca tatgtcatta attaacaaag aaatcttacc 40

15 <210> 8
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> s. epidermidis

20 <400> 8

ES 2 589 927 T3

Met Leu Asn Ala Asp Leu Lys Gln Gln Leu Gln Gln Leu Leu Glu Leu
1 5 10 15
Met Glu Gly Asp Val Glu Phe Val Ala Ser Leu Gly Ser Asp Asp Lys
20 25 30
Ser Asn Glu Leu Lys Glu Leu Leu Asn Glu Ile Ala Glu Met Ser Ala
35 40 45
His Ile Thr Ile Thr Glu Lys Ser Leu Lys Arg Thr Pro Ser Phe Ser
50 55 60
Val Asn Arg Pro Gly Glu Glu Thr Gly Ile Thr Phe Ala Gly Ile Pro
65 70 75 80
Leu Gly His Glu Phe Asn Ser Leu Val Leu Ala Ile Leu Gln Val Ser
85 90 95
Gly Arg Ala Pro Lys Glu Lys Gln Ser Ile Ile Asp Gln Ile Lys Gly
100 105 110
Leu Glu Gly Pro Phe His Phe Glu Thr Phe Val Ser Leu Thr Cys Gln
115 120 125
Lys Cys Pro Asp Val Val Gln Ala Leu Asn Leu Met Ser Val Ile Asn
130 135 140
Pro Asn Ile Thr His Thr Met Ile Asp Gly Ala Val Phe Arg Glu Glu
145 150 155 160
Ser Glu Asn Ile Met Ala Val Pro Ala Val Phe Leu Asp Gly Gln Glu
165 170 175
Phe Gly Asn Gly Arg Met Thr Val Gln Asp Ile Leu Thr Lys Leu Gly
180 185 190
Ser Thr Gln Asp Ala Ser Glu Phe Asn Asp Lys Asp Pro Tyr Asp Val
195 200 205
Leu Ile Val Gly Gly Gly Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Ile Tyr Thr
210 215 220
Ala Arg Lys Gly Leu Arg Thr Gly Ile Val Ala Asp Arg Ile Gly Gly
225 230 235 240
Gln Val Asn Asp Thr Ala Gly Ile Glu Asn Phe Ile Thr Val Lys Glu
245 250 255
Thr Thr Gly Ser Glu Phe Ser Ser Asn Leu Ala Glu His Ile Ala Gln
260 265 270
Tyr Asp Ile Asp Thr Met Thr Gly Ile Arg Ala Thr Asn Ile Glu Lys
275 280 285
Thr Asp Ser Ala Ile Arg Val Thr Leu Glu Asn Asp Ala Val Leu Glu
290 295 300

ES 2 589 927 T3

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

<210> 9
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> *S. aureus*

5

<400> 9

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

10

ES 2 589 927 T3

210	215	220
Ala Arg Lys Gly Leu Arg Thr Gly Ile Val Ala Asp Arg Ile Gly Gly		
225	230	235
Gln Val Asn Asp Thr Ala Gly Ile Glu Asn Phe Ile Thr Val Lys Glu		240
	245	250
Thr Thr Gly Ser Glu Phe Ser Ser Asn Leu Ala Ala His Ile Asp Gln		255
	260	265
Tyr Asp Ile Asp Ala Met Thr Gly Ile Arg Ala Thr Asp Ile Glu Lys		270
	275	280
Thr Asp Glu Ala Ile Lys Val Thr Leu Glu Asn Gly Ala Val Leu Glu		285
	290	295
Ser Lys Thr Val Ile Ile Ala Thr Gly Ala Gly Trp Arg Lys Leu Asn		300
305	310	315
Ile Pro Gly Glu Glu Gln Leu Ile Asn Lys Gly Val Ala Phe Cys Pro		320
	325	330
His Cys Asp Gly Pro Leu Phe Glu Asn Lys Asp Val Ala Val Ile Gly		335
	340	345
Gly Gly Asn Ser Gly Val Glu Ala Ala Ile Asp Leu Ala Gly Ile Val		350
	355	360
Asn His Val Thr Leu Phe Glu Phe Ala Ser Glu Leu Lys Ala Asp Asn		365
	370	375
Val Leu Gln Asp Arg Leu Arg Ser Leu Ser Asn Val Asp Ile Lys Thr		380
385	390	395
Asn Ala Lys Thr Thr Glu Val Val Gly Glu Asp His Val Thr Gly Ile		400
	405	410
Arg Tyr Glu Asp Met Ser Thr Gly Glu Glu His Leu Leu Asn Leu Asp		415
	420	425
Gly Ile Phe Val Gln Ile Gly Leu Leu Pro Asn Thr Ser Trp Leu Lys		430
	435	440
Asp Ala Val Glu Leu Asn Glu Arg Gly Glu Ile Val Ile Asp Arg Asn		445
	450	455
Asn Asn Thr Asn Val Pro Gly Ile Phe Ala Ala Gly Asp Val Thr Asp		460
465	470	475
Gln Lys Asn Lys Gln Ile Ile Ile Ser Met Gly Ala Gly Ala Asn Ala		480
	485	490
Ala Leu Asn Ala Phe Asp Tyr Ile Ile Arg Asn		495
	500	505

<210> 10
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> *S. aureus*

5

<400> 10

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

10

ES 2 589 927 T3

Lys Cys Pro Asp Val Val Gln Ala Leu Asn Leu Met Ser Val Ile Asn
 130 135 140
 Pro Asn Ile Thr His Ser Met Ile Asp Gly Ala Val Phe Arg Glu Glu
 145 150 155 160
 Ser Glu Asn Ile Met Ala Val Pro Ala Val Phe Leu Asn Gly Glu Glu
 165 170 175
 Phe Gly Asn Gly Arg Met Thr Ile Gln Asp Ile Leu Ser Lys Leu Gly
 180 185 190
 Ser Thr Ala Asp Ala Ser Glu Phe Glu Asn Lys Glu Pro Tyr Asp Val
 195 200 205
 Leu Ile Val Gly Gly Gly Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Ile Tyr Thr
 210 215 220
 Ala Arg Lys Gly Leu Arg Thr Gly Ile Val Ala Asp Arg Ile Gly Gly
 225 230 235 240
 Gln Val Asn Asp Thr Ala Gly Ile Glu Asn Phe Ile Thr Val Lys Glu
 245 250 255
 Thr Thr Gly Ser Glu Phe Ser Ser Asn Leu Ala Ala His Ile Asp Gln
 260 265 270
 Tyr Asp Ile Asp Ala Met Thr Gly Ile Arg Ala Thr Asp Ile Glu Lys
 275 280 285
 Thr Asp Glu Ala Ile Lys Val Thr Leu Glu Asn Gly Ala Val Leu Glu
 290 295 300
 Ser Lys Thr Val Ile Ile Ala Thr Gly Ala Gly Trp Arg Lys Leu Asn
 305 310 315 320
 Ile Pro Gly Glu Glu Gln Leu Ile Asn Lys Gly Val Ala Phe Cys Pro
 325 330 335
 His Cys Asp Gly Pro Leu Phe Glu Asn Lys Asp Val Ala Val Ile Gly
 340 345 350
 Gly Gly Asn Ser Gly Val Glu Ala Ala Ile Asp Leu Ala Gly Ile Val
 355 360 365
 Asn His Val Thr Leu Phe Glu Phe Ala Ser Glu Leu Lys Ala Asp Asn
 370 375 380
 Val Leu Gln Asp Arg Leu Arg Ser Leu Ser Asn Val Asp Ile Lys Thr
 385 390 395 400
 Asn Ala Lys Thr Thr Glu Val Val Gly Glu Asp His Val Thr Gly Ile
 405 410 415
 Arg Tyr Glu Asp Met Ser Thr Gly Glu Glu His Leu Leu Asn Leu Asp
 420 425 430
 Gly Ile Phe Val Gln Ile Gly Leu Leu Pro Asn Thr Ser Trp Leu Lys
 435 440 445
 Asp Ala Val Glu Leu Asn Glu Arg Gly Glu Ile Val Ile Asp Cys Asn
 450 455 460
 Asn Asn Thr Asn Val Pro Gly Ile Phe Ala Ala Gly Asp Val Thr Asp
 465 470 475 480
 Gln Lys Asn Lys Gln Ile Ile Ile Ser Met Gly Ala Gly Ala Asn Ala
 485 490 495
 Ala Leu Asn Ala Phe Asp Tyr Ile Ile Arg Asn
 500 505

<210> 11
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Cebador PCR

10

<400> 11
 gggctcagcg attttaccta ctaaactaa accag

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inmunógeno polipeptídico que comprende una secuencia de aminoácidos con hasta 9 alteraciones respecto a la SEQ ID NO: 1, en donde dicho polipéptido proporciona inmunidad protectora contra *S. aureus*, y en donde dicho inmunógeno polipeptídico no es el polipéptido de la SEQ ID NO: 1, para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.
- 10 2. El polipéptido para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de aminoácidos comprende los aminoácidos 178-189 de la SEQ ID NO: 1.
- 15 3. El polipéptido para el uso de la reivindicación 2, en el que dicha secuencia de aminoácidos tiene hasta 5 alteraciones de aminoácidos respecto a la SEQ ID NO: 1.
- 20 4. El polipéptido para el uso de la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido consiste en los aminoácidos 22-213 de la SEQ ID NO: 2.
- 25 5. El polipéptido para el uso de la reivindicación 3, en el que dicha secuencia de aminoácidos tiene hasta 3 alteraciones de aminoácidos respecto a la SEQ ID NO: 1.
- 30 6. El polipéptido para el uso de la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido está sustancialmente purificado.
- 35 7. El inmunógeno para el uso de cualquier reivindicación anterior, que comprende además una o más regiones o restos adicionales unidos covalentemente a dicha secuencia de aminoácidos en el extremo carboxilo o en el extremo amino, en donde cada región o resto se selecciona independientemente entre una región o un resto que tienen al menos una de las siguientes propiedades: mejora la respuesta inmunitaria, facilita la purificación o facilita la estabilidad polipeptídica.
8. Un inmunógeno polipeptídico para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde la terapia es la profilaxis de infección por *S. aureus*.
9. Uso de un inmunógeno polipeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la fabricación de un medicamento para la profilaxis de infección por *S. aureus*.
10. Una combinación de un inmunógeno polipeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y otro inmunógeno para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.

MGHHHHHHHHSSGHIEGRHMSLINKELLPFTAQAFDPKQDFKEVTQEDLKGSWSVVCFYPADFSFVCPTLEL
DLQNQYEELQKLGVNVFSVSTDTHFVHKAWHDHSDAISKITTYTMIGDPSQITITRNFDVLDEATGLAQRGTFIIDP
DGVVQASEINADGIGRDASTLAHKIKAAQYVRKNPGEVCPAKWEEGAKTLQPGLDLVGKIAEQ

FIG. 1

SEQ ID NO: 1 MSLINKEILLPFTAQAFDPKQDFKEVTQEDLKGSWSVVCFYPADFSFVCPTLELQ
SEQ ID NO: 6 MSLINKEILLPFTAQAYDPKKDEFKEVTQEDFKGSWNVVCFYPADFSFVCPTLELQ
SEQ ID NO: 1 EELQKLGVNVFSVSTDTHFVHKAWHDHSDAISKITTYTMIGDPSQITITRNFDVLDEATGLA
SEQ ID NO: 6 AKLQELGVNVYSVSTDTHFVHKAWHDHSDAISKLEYSMIGDPSQITITRNFDVLDEETGLA
SEQ ID NO: 1 QRGTFIIDPDGVVQASEINADGIGRDASTLAHKIKAAQYVRKNPGEVCPAKWEEGAKTLQ
SEQ ID NO: 6 QRGTFIIDPDGVVQAAEINADGIGRDASTLVNKIKAAQYVRQHPGEVCPAKWEEGSESLO
SEQ ID NO: 1 PGLDLVGKI
SEQ ID NO: 6 PGLDLVGKI

FIG. 2

ATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCATATCGAAGGTCGTCATATGTCATTAATT
AACAAAAGAAATCTTACCATTTACAGCGCAAGCTTTTCGATCCAAAAAAGATCAATTTAAAGAAGTTACACAAGAA
GATTTAAAAGGTTCTTGGAGCGTAGTATGCTTCTATCCTGCTGACTTCTCATTTCGTTTGTCCAAGTGAATTAGAA
GACTTACAAAACCAATATGAAGAATTACAAAAATTAGGCGTAAATGTATTCTCAGTATCAACTGATACTCACTTC
GTACACAAAGCATGGCATGACCATTGAGATGCAATTAGCAAAATCACTTACACTATGATTGGTGACCCATCACAA
ACAATCACTCGTAATTTTGTATGATTAGATGAAGCTACTGGTTTAGCTCAACGTGGTACATTTCATTATCGACCCA
GACGGTGTGTACAAGCATCTGAAATTAACGCTGACGGAATTGGCCGTGACGCTAGTACATTAGCTCACAAAATC
AAAGCAGCTCAATATGTTTCGTA AAAACCCTGGCGAAGTATGCCAGCTAAATGGGAAGAAGGCGCTAAAACATTG
CAACCTGGTTTAGATTTAGTAGGTA AAAATCGCTGAGCAATAA

FIG. 3

ATGCTTAATGCTGATTTAAAAACAACAACCTTAAACAACCTATTAGAATAATGGAGGGCAACGTTGAATTCGTTGCC
 AGCCTTGGTTCAGATGATAAATCAAAGAACCTTAAAGATTTGTTGACAGAAATTACTGATATGTCACCTAGACTA
 TCTCTTTCTGAAAAATCTTTAAAACGTACACCAAGTTTCTCAGTCAATCGTCCTGGCGAAGAAACAGGTGTAACA
 TTTGCAGGTATCCATTAGGTACGAGTTTAACTCACTTGTGTTTAGCAATTTTACAGGTTAGTGGTCGTGCACCT
 AAAGAAAAACAGTCAATCATTGACCAAATTAATAAATAAGAAGTTTCAATCCATTTTGAACATTCATTAGTTTA
 ACGTGTCAAAAATGTCTGATGTCTGTTCAAGCACTTAACTTAATGAGTGTGATCAACCCCTAACATCACGCATTCT
 ATGATTGATGGTGCAGTGTTCCTGGAAGAATCTGAAAACATCATGGCAGTCCCTGCTGTCTTTTAAATGGCGAA
 GAATTTGGCAATGGTCGTATGACAATCCAAGATATTCCTTCGAAAACCTAGGCAGTACGGCAGATGCATCTGAGTTT
 GAAAATAAAGAACCCTTATGATGTCTTAATCGTTGGTGGTGGTCTGCTAGTGGTAGTGCAGCGATTTACACAGCA
 CGTAAAGGTTTACGTACTGGTATAGTTGCTGATCGTATCGGTGGCCAAGTTAATGATACTGCTGGTATGAGAAC
 TTCATTACTGTTAAAGAAACAACCTGGTTCTGAATTTTCTTCTAACTTAGCAGCGCACATTGATCAATATGACATT
 GATGCAATGACAGGTATAACGTGCTACAGATATCGAAAAGACTGACGAAGCAATTAAGTTACGTTAGAAAACGGT
 GCTGTCTTAGAAAGTAAAACAGTCATTATTGCTACTGGTGCAGGTTGGCGTAAGCTAAACATTCAGGTGAAGAG
 CAATTGATTAATAAAGGTGTTGCATTCTGCCCTCACTGTGACGGACCTCTATTTGAAAATAAAGACGTAGCAGTT
 ATCGGTGGCGTAACTCTGGGGTTGAAGCAGCAATTGACCTTGTGGTATCGTTAATCATGTTACATTATTTCGAA
 TTCGCTAGCGAATTAAGAAGCAGACAACGTGTTACAAGATCGTTTACGTTCTTTATCAAATGTTGATATCAAAA
 AATGCCAAAACCTACTGAAGTTGTGCGAGAAGACCATGTTACAGGTATACGTTACGAAGACATGAACACCGGCGAA
 GAACATCTACTTAACTTAGATGGTATCTTTGTTCAAATGGTTTACTTCAAACACATCATGGTTAAACGATGCT
 GTTGAATTAACGAACGTGGTGAATTTGTGATGATCGTAACAATAATACGAATGTTCCCTGGAATATTTGCTGCT
 GCGATGTCACAGATCAGAAGAACAACAATTTATCATTTCAATGGGCGCTGGTGCAAATGCAGCATTAAATGCC
 TTTGACTATATTATCAGAAAC

FIG. 4

	1	50
SEQ ID NO: 8	MLNADLKQQLQQLLELMEGDVEFVASLGSDDKSNEKELLNEIAEMSAHI	
SEQ ID NO: 3	MLNADLKQQLKQLLELMEGNVEFVASLGSDDKSKEKDLLTEITDMSPRL	
SEQ ID NO: 9	MLNADLKQQLKQLLELMEGNVEFVASLGSDEKSKEKELLTEISDMSPRL	
SEQ ID NO: 10	MLNADLKQQLKQLLELMEGNVEFVASLGSDEKSKEKELLTEISDMSPRL	
	51	100
SEQ ID NO: 8	TITEKSLKRTPSFSVNRPEETGITFAGIPLGHEFNLSVLAILQVSGRAP	
SEQ ID NO: 3	SLSEKSLKRTPSFSVNRPEETGVTFAGIPLGHEFNLSVLAILQVSGRAP	
SEQ ID NO: 9	SLSEKSLKRTPSFSVNRPEETGVTFAGIPLGHEFNLSVLAILQVSGRAP	
SEQ ID NO: 10	SLSEKSLKRTPSFSVNRPEETGVTFAGIPLGHEFNLSVLAILQVSGRAP	
	101	150
SEQ ID NO: 8	KEKQSIIDQIKGLEGPFHFETFVSLTCQKCPDVVQALNLM SVINPNITHT	
SEQ ID NO: 3	KEKQSIIDQIKKLEGSFHFETFISLTCQKCPDVVQALNLM SVINPNITHS	
SEQ ID NO: 9	KEKQSIIDQIKNLEGSFHFETFISLTCQKCPDVVQALNLM SVINPNITHS	
SEQ ID NO: 10	KEKQSIIDQIKNLEGSFHFETFISLTCQKCPDVVQALNLM SVINPNITHS	
	151	200
SEQ ID NO: 8	MIDGAVFREES ENIMAVPAVFLDGQEFNGRMTIQDILTKLGSTADASEF	
SEQ ID NO: 3	MIDGAVFREES ENIMAVPAVFLNGEFGNGRMTIQDILSKLGSTADASEF	
SEQ ID NO: 9	MIDGAVFREES ENIMAVPAVFLNGEFGNGRMTIQDILSKLGSTADASEF	
SEQ ID NO: 10	MIDGAVFREES ENIMAVPAVFLNGEFGNGRMTIQDILSKLGSTADASEF	

FIG. 5A

201 250
 SEQ ID NO: 8 **NDKDPYDVLIVGGGPASGSAAIYTARKGLRTGIVADRIGGQVNDTAGIEN**
 SEQ ID NO: 3 **ENKEPYDVLIVGGGPASGSAAIYTARKGLRTGIVADRIGGQVNDTAGIEN**
 SEQ ID NO: 9 **ENKEPYDVLIVGGGPASGSAAIYTARKGLRTGIVADRIGGQVNDTAGIEN**
 SEQ ID NO: 10 **ENKEPYDVLIVGGGPASGSAAIYTARKGLRTGIVADRIGGQVNDTAGIEN**

251 300
 SEQ ID NO: 8 **FITVKETTGSSEFSSNLAEHIAQYDIDTMTGIRATNIEKTDSAIRVTLEND**
 SEQ ID NO: 3 **FITVKETTGSSEFSSNLAHIDQYDIDAMTGTIRATDIEKTDEAIKVTLENG**
 SEQ ID NO: 9 **FITVKETTGSSEFSSNLAHIDQYDIDAMTGTIRATDIEKTDEAIKVTLENG**
 SEQ ID NO: 10 **FITVKETTGSSEFSSNLAHIDQYDIDAMTGTIRATDIEKTDEAIKVTLENG**

301 350
 SEQ ID NO: 8 **AVLESKTVIIATGAGWRKLNIPGEDRLINKGVAFCPHCDGPLFENKDVAV**
 SEQ ID NO: 3 **AVLESKTVIIATGAGWRKLNIPGEEQLINKGVAFCPHCDGPLFENKDVAV**
 SEQ ID NO: 9 **AVLESKTVIIATGAGWRKLNIPGEEQLINKGVAFCPHCDGPLFENKDVAV**
 SEQ ID NO: 10 **AVLESKTVIIATGAGWRKLNIPGEEQLINKGVAFCPHCDGPLFENKDVAV**

351 400
 SEQ ID NO: 8 **IGGNSGVEAAIDLAGIVKHVTLFEYASELKADSVLQERLRSLPNVDIKT**
 SEQ ID NO: 3 **IGGNSGVEAAIDLAGIVNHVTLFEFASELKADNVLQDRRLRSLSNVDIKT**
 SEQ ID NO: 9 **IGGNSGVEAAIDLAGIVNHVTLFEFASELKADNVLQDRRLRSLSNVDIKT**
 SEQ ID NO: 10 **IGGNSGVEAAIDLAGIVNHVTLFEFASELKADNVLQDRRLRSLSNVDIKT**

401 450
 SEQ ID NO: 8 **SAKTTEVIGDDYVTGISYEDMTTGESQVNVLDGIFVQIGLVPNTSWLQNA**
 SEQ ID NO: 3 **NAKTTEVVGEDHVTGIRYEDMNTGEEHLLNLDGIFVQIGLLPNTSWLNDA**
 SEQ ID NO: 9 **NAKTTEVVGEDHVTGIRYEDMSTGEEHLLNLDGIFVQIGLLPNTSWLKDA**
 SEQ ID NO: 10 **NAKTTEVVGEDHVTGIRYEDMSTGEEHLLNLDGIFVQIGLLPNTSWLKDA**

451 500
 SEQ ID NO: 8 **VELNERGEVMINRDNATNVPGIFAAGDVTQKNKQIIISMGAGANAALNA**
 SEQ ID NO: 3 **VELNERGEIVIDRNNNTNVPGIFAAGDVTQKNKQIIISMGAGANAALNA**
 SEQ ID NO: 9 **VELNERGEIVIDRNNNTNVPGIFAAGDVTQKNKQIIISMGAGANAALNA**
 SEQ ID NO: 10 **VELNERGEIVIDCNNNTNVPGIFAAGDVTQKNKQIIISMGAGANAALNA**

501
 SEQ ID NO: 8 **FDYIIRN**
 SEQ ID NO: 3 **FDYIIRN**
 SEQ ID NO: 9 **FDYIIRN**
 SEQ ID NO: 10 **FDYIIRN**

FIG. 5B

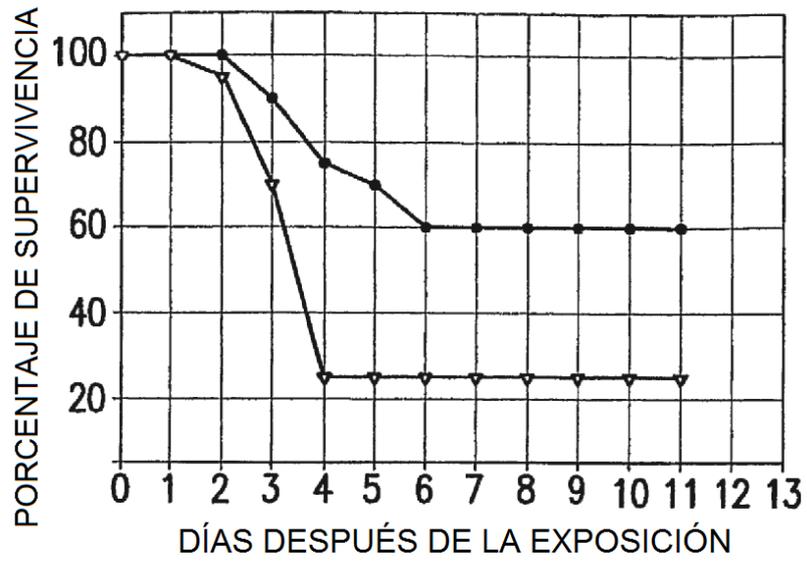


FIG.6A

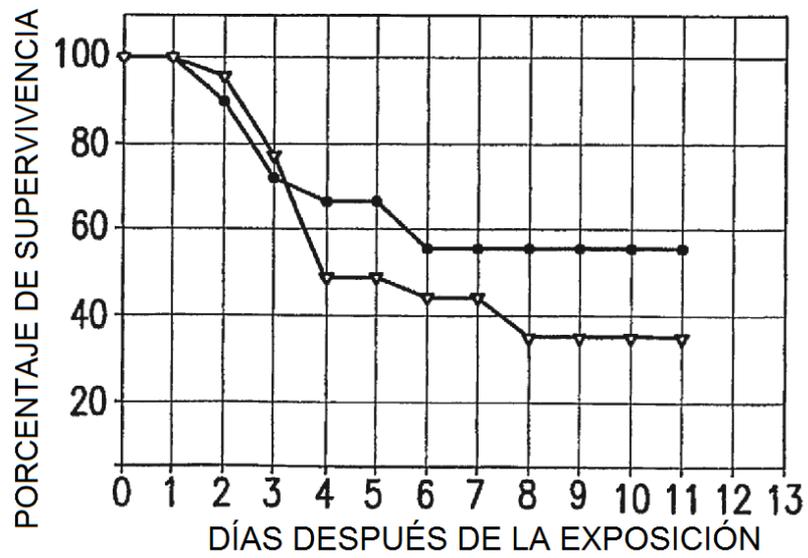


FIG.6B