

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 416**

51 Int. Cl.:

A61K 39/085 (2006.01)

A61K 39/385 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.11.2010 PCT/IB2010/054934**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11051917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2010 E 10782040 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2493498**

54 Título: **Purificación de sacáridos capsulares de Staphilococcus aureus de tipo 5 y de tipo 8**

30 Prioridad:

30.10.2009 US 256905 P

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

25.07.2017

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart , BE**

72 Inventor/es:

**COSTANTINO, PAOLO;
ROMANO, MARIA ROSARIA y
BERTI, FRANCESCO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 626 416 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

Purificación de sacáridos capsulares de *Staphylococcus aureus* de tipo 5 y de tipo 8

Campo técnico

5 La presente invención se encuentra en el campo de la purificación de polisacáridos capsulares bacterianos, particularmente aquellos de *Staphylococcus aureus* de tipo 5 y de tipo 8, y particularmente para su uso en la preparación de vacunas.

Antecedentes de la técnica

10 Los sacáridos capsulares de bacterias se han usado durante muchos años en vacunas contra bacterias encapsuladas. Dado que los sacáridos son antígenos T-independientes, sin embargo, son poco inmunogénicos. La conjugación con un vehículo puede convertir a los antígenos T-independientes en antígenos T-dependientes, mejorando de ese modo las respuestas de memoria y permitiendo que se desarrolle la inmunidad protectora. Las vacunas de sacáridos más eficaces se basan, por lo tanto, en glucoconjugados, y la vacuna conjugada prototipo fue contra *Haemophilus influenzae* tipo b ('Hib') [por ejemplo, véase capítulo 14 de la ref. 96].

15 Otra bacteria para la cual se han descrito vacunas conjugadas es *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*). Se han aislado diversos polisacáridos a partir de *S.aureus* para su uso en glucoconjugados. Dos polisacáridos de interés particular son los polisacáridos capsulares de tipo 5 y de tipo 8. Aproximadamente el 60 % de las cepas de *S.aureus* humano son de tipo 8 y aproximadamente el 30 % son de tipo 5. Gran parte del trabajo sobre los conjugados de tipo 5 y de tipo 8 se ha realizado por Fattom y col., y se describe en los documentos tales como las referencias 1 a 9.

20 El punto de partida para las vacunas basadas en polisacáridos es el propio polisacárido, y éste se purifica generalmente a partir de la bacteria objetivo. Fattom y col. Han desarrollado un procedimiento complejo para la purificación de los polisacáridos capsulares de tipo 5 y de tipo 8 que se describen en detalle en la referencia 1, e implican las siguientes etapas clave después del cultivo bacteriano: suspensión de células bacterianas en tampón, tratamiento con lisostafina, tratamiento con DNasa y RNasa, centrifugación, diálisis contra tampón, tratamiento con proteasa, diálisis adicional, filtración, adición de etanol al 25 % con cloruro de calcio para precipitar contaminantes; adición complementaria de etanol al 75 % para precipitar el polisacárido; recolección y secado del precipitado; recolección y secado del precipitado; cromatografía de intercambio aniónico; diálisis; liofilización; cromatografía de exclusión por tamaño; diálisis y liofilización final.

25 El procedimiento Fattom implica el uso de lisostafina para lisar las paredes de células bacterianas y liberar de ese modo el polisacárido capsular. Sin embargo, esta etapa consume tiempo y hace al procedimiento difícil de llevar a cabo en un entorno industrial. También incrementa el coste global y la complejidad del procedimiento. Otros investigadores han intentado omitir esta etapa y desarrollar un procedimiento más simple y eficaz de purificación del polisacárido. Por ejemplo, la referencia [10] describe un procedimiento alternativo que implica el tratamiento en autoclave de células de *S.aureus*, la ultrafiltración del sobrenadante que contiene polisacáridos, la concentración, la liofilización, el tratamiento con metaperyodato de sodio, la ultrafiltración adicional, la diafiltración, la cromatografía líquida de exclusión por tamaño de alto rendimiento, la diálisis y el secado por congelación. Los autores sugieren que este procedimiento proporciona un buen rendimiento y es adecuado para la producción a gran escala del polisacárido. En este procedimiento, el tratamiento con lisostafina se reemplaza al tratar en autoclave para liberar el polisacárido capsular. El procedimiento se desarrolló adicionalmente en la referencia [11]. Una etapa importante en estos procedimientos alternativos es el tratamiento con metaperyodato de sodio. Esta etapa se lleva a cabo para eliminar la contaminación por ácido teicoico del polisacárido capsular. Sin embargo, una vez más, esta etapa incrementa la duración, complejidad y coste global del procedimiento. La referencia [12] describe un procedimiento similar que nuevamente implica tratar en autoclave para liberar el polisacárido capsular y tratamiento con metaperyodato de sodio para eliminar el ácido teicoico. En contraste, la mayoría de los otros grupos usa procedimientos que retienen el tratamiento con lisostafina (véase, como ejemplo, las referencias 13, 14, 15, 16, 17 y 18), que a veces incluyen el tratamiento con metaperyodato de sodio (por ejemplo, en las referencias 13 y 14).

30 Los procedimientos anteriores son complejos y pueden dejar contaminación en el polisacárido resultante. Existe, por tanto, una necesidad por procedimientos adicionales y mejorados para purificar polisacáridos capsulares de *S.aureus* tipo 5 y de tipo 8, y particularmente por procedimientos menos complejos que den como resultado una menor contaminación.

Descripción de la invención

35 La invención se basa en un procedimiento de purificación en el que el polisacárido se libera inicialmente a partir de las células bacterianas mediante el tratamiento con un ácido. Esta etapa elimina la necesidad del tratamiento con lisostafina y se puede usar como una alternativa para el tratamiento con autoclave, como en los procedimientos anteriores. Los inventores han descubierto que el procedimiento da como resultado un polisacárido purificado con baja contaminación con ácido teicoico. Esto significa que no es necesario tratar el polisacárido con metaperyodato de sodio. El polisacárido purificado también tiene baja contaminación de peptidoglicanos, haciéndolo particularmente adecuado para usos médicos. El procedimiento de los inventores puede ser rápido y sencillo debido a que no son

necesarias las etapas laboriosas en los procedimientos previos.

5 Los inventores proporcionan un procedimiento para liberar el polisacárido capsular a partir de células de *S.aureus* de tipo 5 o de tipo 8, que comprende la etapa de tratar las células con ácido. Además, se desvela un procedimiento para la purificación de polisacárido capsular de células de *S.aureus* de tipo 5 o de tipo 8 que comprende este procedimiento. Se pueden incluir otras etapas de procesamiento en el procedimiento, tales como tratamiento enzimático, por ejemplo, para eliminar los contaminantes de ácido nucleico, proteínas y/o péptidoglicano; diafiltración, por ejemplo, para eliminar contaminantes de bajo peso molecular; cromatografía de intercambio aniónico, por ejemplo, para eliminar proteína residual; y concentración.

10 Por lo tanto, los inventores desvelan un procedimiento para la purificación de polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, que comprende la etapa de liberar el polisacárido a partir de células de *S.aureus* de tipo 5 o de tipo 8 mediante el tratamiento de las células con ácido. De manera similar, los inventores desvelan, en un procedimiento para la purificación de polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, la mejora que consiste en el uso del tratamiento con ácido de células de *S.aureus* de tipo 5 o de tipo 8 para liberar el polisacárido a partir de las células. La liberación mediante el tratamiento con ácido elimina la necesidad del tratamiento con lisostafina o de tratar en autoclave para liberar el polisacárido.

15 Los inventores también desvelan un procedimiento para la purificación de polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, en el que el procedimiento no implica una etapa de tratamiento con lisostafina. De manera similar, los inventores desvelan un procedimiento para la purificación de polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, en el que el procedimiento no implica una etapa de tratamiento con metaperyodato de sodio. Típicamente, el procedimiento no implica una o ambas de estas etapas.

20 Los inventores desvelan un procedimiento para la purificación de polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, en el que el procedimiento proporciona una composición que comprende el polisacárido y un nivel de contaminación de peptidoglicanos que es menor del 5 % (por ejemplo, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, $\leq 1\%$, etc.) en peso de peptidoglicano en relación con el peso total del polisacárido. Típicamente, la composición comprende menos del 4 %, particularmente menos del 3 % en peso de peptidoglicano. Los inventores han descubierto que se pueden obtener niveles de aproximadamente el 2 % o incluso aproximadamente el 1 % al usar los procedimientos de la invención. Los inventores han descubierto que las composiciones con este nivel de peptidoglicano son útiles en la elaboración de vacunas. En contraste, la referencia 17 enseña que los niveles por encima del 5 % deberían usarse para este propósito. El nivel de contaminación de peptidoglicanos se puede medir usando los procedimientos descritos en el presente documento.

25 De manera similar, los inventores desvelan un procedimiento para la purificación de polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, en el que el procedimiento proporciona una composición que comprende el polisacárido y un nivel de contaminación de proteínas que es menor del 5 % (por ejemplo, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, $\leq 1\%$, $\leq 0,5\%$, etc.) en peso de proteína en relación con el peso total del polisacárido. Típicamente, la composición comprende menos del 3 %, en particular aproximadamente el 2,4 % en peso de proteína. El nivel de contaminación de proteínas se puede medir usando un ensayo MicroBCA (Pierce).

30 Se desvela un procedimiento para la purificación de polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, en el que el procedimiento proporciona una composición que comprende el polisacárido y un nivel de contaminación con ácidos nucleicos que es menor del 1 % (por ejemplo, $\leq 0,75\%$, $\leq 0,50\%$, $\leq 0,25\%$, $\leq 0,10\%$, $\leq 0,01\%$, etc.) en peso de ácidos nucleico en relación con el peso total del polisacárido. Típicamente, la composición comprende menos del 0,25 %, en particular aproximadamente el 0,09 % en peso de ácido nucleico. El nivel de contaminación con ácidos nucleicos se puede medir mediante absorción a 260 nm en un espectrofotómetro.

35 Se desvela un procedimiento para la purificación de polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, en el que (a) el nivel de contaminación con ácido del péptidoglicano es menor del 5 % (tal como se describe anteriormente); (b) el nivel de contaminación de proteínas es menor del 5 % (tal como se describe anteriormente); (c) el nivel de contaminación con ácidos nucleicos que es menor del 1 % (tal como se describe anteriormente).

También se desvela una composición que comprende un polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, que se obtiene mediante cualquiera de los procedimientos de la invención.

40 Los autores desvelan una composición que comprende polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, en la que la composición comprende un nivel de contaminación de peptidoglicano que es menor del 5 % (por ejemplo, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, $\leq 1\%$, etc.) en peso de peptidoglicano en relación con el peso total del polisacárido. Típicamente, la composición comprende menos del 3 %, particularmente menos del 2 % en peso de péptidoglicano. Las composiciones con niveles de aproximadamente el 2 % o incluso aproximadamente el 1 % se desvelan de manera específica.

45 De manera similar, los inventores desvelan una composición que comprende polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, en la que la composición comprende un nivel de contaminación de proteína que es menor del 5 % (por ejemplo, $\leq 4\%$, $\leq 3\%$, $\leq 2\%$, $\leq 1\%$, $\leq 0,5\%$, etc.) en peso de proteína en relación con el peso total del polisacárido. Típicamente, la composición comprende menos del 3 %, en particular aproximadamente el 2,4 % en

peso de proteína.

Los inventores desvelan una composición que comprende polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, en la que la composición comprende un nivel de contaminación de ácidos nucleicos que es menor del 1 % (por ejemplo, $\leq 0,75$ %, $\leq 0,50$ %, $\leq 0,25$ %, $\leq 0,10$ %, $\leq 0,01$ %, etc.) en peso de ácido nucleico en relación con el peso total del polisacárido. Típicamente, la composición comprende menos del 0,25 %, en particular aproximadamente el 0,09 % en peso de ácido nucleico.

Los inventores desvelan una composición que comprende polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, en la que a) un nivel de contaminación con ácido de péptidoglicano es menor del 5 % (tal como se describe anteriormente); (b) el nivel de contaminación de proteína es menor del 5 % (tal como se describe anteriormente); (c) el nivel de contaminación con ácido nucleico que es menor del 1 % (tal como se describe anteriormente).

La invención proporciona un procedimiento para crear una composición inmunogénica que comprende un polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 conjugado con una molécula de vehículo y un polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 8 conjugado con una molécula de vehículo, dicho procedimiento comprende:

- (a) un procedimiento para purificar polisacárido capsular de células de *S. aureus* de tipo 5 que comprende una etapa de liberación de polisacárido capsular a partir de las células mediante tratamiento ácido de las células, en el que las células están en la forma de una pasta de célula húmeda o están suspendidas en medio acuoso, y la masa molecular del polisacárido purificado está entre 2-3500 kDa;
- (b) la conjugación del polisacárido capsular con una molécula de vehículo para crear un conjugado; y
- (c) mezclar el conjugado con un polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 8 conjugado con una molécula de vehículo.

La invención proporciona adicionalmente un procedimiento para crear una composición inmunogénica que comprende un polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 8 conjugado con una molécula de vehículo y un polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 conjugado con una molécula de vehículo, dicho procedimiento comprende:

- (a) un procedimiento para purificar polisacárido capsular de células de *S. aureus* de tipo 8 que comprende una etapa de liberación de polisacárido capsular a partir de las células mediante tratamiento ácido de las células, en el que las células están en la forma de una pasta de célula húmeda o están suspendidas en medio acuoso, y la masa molecular del polisacárido purificado está entre 2-3500 kDa;
- (b) la conjugación del polisacárido capsular con una molécula de vehículo para crear un conjugado; y
- (c) mezclar el conjugado con un polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 8 conjugado con una molécula de vehículo.

La invención se basa en los polisacáridos capsulares de *S. aureus* tipo 5 y de tipo 8. Las estructuras de los polisacáridos capsulares de tipo 5 y tipo 8 se describieron en las referencias y como:

- Tipo 5 \rightarrow 4)- β -D-ManNAcA(3OAc)-(1 \rightarrow 4)- α -L-FucNAc(1 \rightarrow 3)- β -D-FucNAc-(1 \rightarrow
- Tipo 8 \rightarrow 3)- β -D-ManNAcA(4OAc)-(1 \rightarrow 3)- α -L-FucNAc(1 \rightarrow 3)- β -D-FucNAc-(1 \rightarrow .

Datos recientes de espectroscopia por RMN han llevado a una revisión de estas estructuras para:

- Tipo 5 \rightarrow 4)- β -D-ManNAcA-(1 \rightarrow 4)- α -L-FucNAc(3OAc)-(1 \rightarrow 3)- β -D-FucNAc-(1 \rightarrow
- Tipo 8 \rightarrow 3)- β -D-ManNAcA(4OAc)-(1 \rightarrow 3)- α -L-FucNAc(1 \rightarrow 3)- α -D-FucNAc(1 \rightarrow .

Tras la liberación a partir de las células de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8, el polisacárido se puede modificar químicamente en relación con el polisacárido capsular tal como se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, el polisacárido se puede de-O-acetilar (parcial o completamente), de-N-acetilar (parcial o completamente), N-propionar (parcial o completamente), etc. La deacetilación puede tener lugar antes, durante o después de otras etapas de procesamiento, pero típicamente tiene lugar antes de cualquier etapa de conjugación. Dependiendo del polisacárido en particular, la deacetilación puede o no afectar a la inmunogenicidad, por ejemplo, la vacuna NeisVac-C™ usa un polisacárido de-O-acetilado, mientras que la Menjugate™ es acetilada, pero ambas vacunas son eficaces. El efecto de la deacetilación etc. se puede evaluar mediante ensayos habituales. Por ejemplo, la relevancia de la O-acetilación en los polisacáridos capsulares de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8 se trata en la referencia 6. Los polisacáridos naturales se dice en ese documento que tienen el 75 % de O-acetilación. Estos polisacáridos indujeron anticuerpos tanto a la estructura principal del polisacárido como a los grupos O-acetilo. Los polisacáridos con el 0 % de O-acetilación aún produjeron anticuerpos para la estructura principal del polisacárido. Ambos tipos de anticuerpos fueron opsonizantes frente a las cepas de *S. aureus* que variaban en su contenido de O-acetilo. Por lo tanto, los polisacáridos capsulares de tipo 5 o de tipo 8 usados en la presente invención pueden tener entre el 0 y el 100 % de O-acetilación. Por ejemplo, el grado de O-acetilación del polisacárido capsular de tipo 5 puede ser 10-100 %, 10-100 %, 20-100 %, 30-100 %, 40-100 %, 50-100 %, 60-100 %, 70-100 %, 80-100 %, 90-100 %, 50-90 %, 60-90 %, 70-90% o 80-90 %. Como alternativa, se puede usar el polisacárido capsular de tipo 5 O-acetilado al 0 %. De manera similar, el grado de O-acetilación del polisacárido capsular de tipo 8 puede ser 10-100 %, 10-100 %, 20-100 %, 30-100 %, 40-100 %, 50-100 %, 60-100 %, 70-100 %, 80-100 %, 90-100 %, 50-90 %, 60-90 %, 70-90 % o 80-90 %.

Como alternativa, se puede usar el polisacárido capsular de tipo 8 O-acetilado al 0 %. En una realización, el grado de O-acetilación de los polisacáridos capsulares de tipo 5 y de tipo 8 puede ser 10-100 %, 20-100 %, 30-100 %, 40-100 %, 50-100 %, 60-100 %, 70-100 %, 80-100 %, 90-100 %, 50-90 %, 60-90 %, 70-90 % o 80-90 %. En otras realizaciones, se usan polisacáridos capsulares de tipo 5 y de tipo 8 O-acetilados al 0 %. El grado de N-acetilación del polisacárido capsular de tipo 5 usado en la invención puede ser 0-100 %, 50-100 %, 75-100 %, 80-100 %, 90-100 % o 95-100 %. Típicamente, el grado de N-acetilación del polisacárido capsular de tipo 5 es del 100 %. De manera similar, el grado de N-acetilación del polisacárido capsular de tipo 8 usado en la invención puede ser 0-100 %, 50-100 %, 75-100 %, 80-100 %, 90-100 % o 95-100 %. Típicamente, el grado de N-acetilación del polisacárido capsular de tipo 8 es del 100 %. En una realización, el grado de N-acetilación de los polisacáridos capsulares de tipo 5 y de tipo 8 puede ser 0-100 %, 50-100 %, 75-100 %, 80-100 %, 90-100 % o 95-100 %. Típicamente, el grado de N-acetilación de los polisacáridos capsulares de tipo 5 y de tipo 8 es el 100 %.

El grado de O-acetilación del polisacárido se puede determinar mediante cualquier procedimiento conocido en la materia, por ejemplo, mediante RMN de protones (por ejemplo, tal como se describe en las referencias 22, 23, 24 o 25). Se describe un procedimiento adicional en la referencia 26. Se pueden usar procedimientos similares para determinar el grado de N-acetilación del polisacárido. Los grupos O-acetilo se pueden eliminar mediante hidrólisis, por ejemplo mediante tratamiento con una base tal como hidrazina anhidra [27] o NaOH [6]. Se pueden usar procedimientos similares para eliminar los grupos N-acetilo. Para mantener los niveles elevados de O-acetilación en los polisacáridos capsulares de tipo 5 y/o 8, se minimizan los tratamientos que conducen a la hidrólisis de los grupos O-acetilo, por ejemplo, tratamientos en extremos de pH.

Material de partida

El procedimiento de la invención comienza con células de *S.aureus* de tipo 5 o de tipo 8. Típicamente, las células se cultivan mediante fermentación antes de la liberación del polisacárido capsular. Los procedimientos adecuados de cultivo de células de *S.aureus* de tipo 5 o de tipo 8 son bien conocidos por el experto en la materia y se desvelan, como ejemplo, en las referencias 1 a 21 y en las referencias en ese documento. Tras el crecimiento celular, las células normalmente se desactivan. Un procedimiento adecuado para la desactivación es el tratamiento con fenol:etanol, por ejemplo, tal como se describe en la referencia 1.

Las células se pueden centrifugar antes de la liberación del polisacárido capsular. El procedimiento se puede iniciar por lo tanto con las células en forma de una pasta de célula húmeda. Típicamente, sin embargo, las células se resuspenden en un medio acuoso que es adecuado para la siguiente etapa en el procedimiento, por ejemplo, en un tampón o en agua destilada. Las células se pueden lavar con este medio antes de la resuspensión. En otra realización, las células se pueden tratar en suspensión en su medio de cultivo original. Como alternativa, las células se tratan en una forma seca.

Tratamiento con ácido

En el procedimiento de la invención y en los métodos desvelados en el presente documento, las células de *S.aureus* de tipo 5 o de tipo 8 se tratan con ácido. Esta etapa da como resultado la liberación del polisacárido capsular a partir de las células. En contraste, procedimientos previos han usado tratamiento con lisostafina o tratamiento en autoclave para liberar el polisacárido. El tratamiento con ácido de la invención, y tal como se describe en el presente documento, se lleva a cabo preferentemente usando un ácido suave, por ejemplo, ácido acético, para minimizar el daño al polisacárido. El experto en la materia sería capaz de identificar ácidos y condiciones adecuadas (por ejemplo, de concentración, temperatura y/o tiempo) para liberar el polisacárido. Por ejemplo, los inventores han descubierto que es adecuado el tratamiento de células suspendidas a aproximadamente 0,5 mg/ml en agua destilada con ácido acético al 1 % (v/v) a 100 °C durante 2 horas. El tratamiento con otros ácidos, por ejemplo, ácido trifluoroacético u otros ácidos orgánicos, también puede ser adecuado.

La eficacia de diferentes tratamientos con ácidos se puede probar usando procedimientos habituales. Por ejemplo, tras el tratamiento con ácidos, las células se pueden aislar y tratar usando procedimientos conocidos de liberación de polisacárido capsular de *S.aureus* de tipo 5 o de tipo 8 (por ejemplo, el procedimiento basado en lisostafina de la referencia 1) para ver si se puede liberar polisacárido capsular adicional. Si se libera un polisacárido capsular adicional, entonces las condiciones del tratamiento con ácido se pueden alterar de manera que se libere una proporción mayor del sacárido capsular durante el tratamiento con ácido. De esta manera, es posible optimizar las condiciones del tratamiento con ácido de manera que se libere una cantidad óptima del sacárido capsular. Por ejemplo, los inventores han descubierto que tras el tratamiento de células suspendidas en aproximadamente 0,5 mg/ml de agua destilada con ácido acético al 1 % (v/v) a 100 °C durante 2 horas, se libera muy poco sacárido capsular adicional a partir de las células mediante tratamiento posterior con lisostafina.

Los inventores han descubierto que detrás el tratamiento con ácidos, el grado de O-acetilación del polisacárido capsular de tipo 5 puede estar entre 60-100 %. En particular, el grado de O-acetilación puede estar entre el 65-95 %, particularmente 70-90 %. Típicamente, el grado de O-acetilación está entre 75-85 %, por ejemplo, aproximadamente el 80 %. Se pueden obtener valores similares para el sacárido capsular de tipo 8. Si se desea, el grado de O-acetilación del sacárido capsular se puede alterar después mediante etapas de procesamiento adicionales como las tratadas anteriormente.

Tras el tratamiento con ácidos, la mezcla de reacción típicamente se neutraliza. Esto se puede lograr mediante la adición de una base, por ejemplo, NaOH. Las células se pueden centrifugar y el sobrenadante que contiene polisacáridos se recolecta para almacenamiento y/o procesamiento adicional.

Tratamiento enzimático

5 El polisacárido obtenido tras el tratamiento con ácidos puede estar impuro y contaminado con ácidos nucleicos bacterianos y proteínas. Estos contaminantes se pueden eliminar mediante tratamiento enzimático. Por ejemplo, se puede eliminar el ARN mediante el tratamiento con RNasa, el ADN con DNasa y la proteína con proteasa (por ejemplo, pronasa). El experto en la materia sería capaz de identificar enzimas adecuadas y condiciones para la eliminación de los contaminantes. Por ejemplo, los inventores han descubierto que el tratamiento de sobrenadante que contiene polisacáridos con 50 µg/ml cada uno de DNasa y RNasa a 37 °C durante 6-8 horas es adecuado. Otras condiciones adecuadas se desvelan en la bibliografía, por ejemplo, en la referencia 1.

15 El polisacárido obtenido tras el tratamiento con ácidos también puede o como alternativa contaminarse con peptidoglicano. Este contaminante también puede eliminarse mediante tratamiento enzimático. Los inventores han descubierto que el tratamiento con mutanolisina es eficaz para eliminar la contaminación de peptidoglicanos. El experto en la materia sería capaz de identificar condiciones adecuadas para la remoción del péptidoglicano con mutanolisina. Como ejemplo, los inventores han encontrado que el tratamiento de sobrenadante que contiene polisacáridos con 180 U/ml cada uno de mutanolisina a 37 °C durante 16 horas es adecuado. Tras el tratamiento, la suspensión se puede aclarar mediante centrifugación y recolectar el sobrenadante que contiene polisacáridos para el almacenamiento y/o el procesamiento adicional.

20 Diafiltración

El procedimiento de la invención puede implicar una etapa de diafiltración. Esta etapa se realiza típicamente tras el tratamiento con ácido y/o el tratamiento enzimático anteriormente tratado. Los inventores han descubierto que una etapa de diafiltración, particularmente mediante filtración de flujo tangencial, es particularmente eficaz para eliminar impurezas del polisacárido. Las impurezas son típicamente contaminantes de bajo peso molecular como fragmentos de teicoico y/o peptidoglicano. La filtración de flujo tangencial se lleva a cabo de manera adecuada contra NaCl 1 M (por ejemplo, contra aproximadamente 10 volúmenes) y después tampón NaPi 10 mM a pH 7,2 (por ejemplo, contra otros 10 volúmenes). La membrana de filtración debería, por lo tanto, ser una que permita la circulación de contaminantes de bajo peso molecular mientras retiene el polisacárido capsular. Es típica una línea de corte en el intervalo de 10 kDa - 30 kDa. Los inventores han descubierto que la filtración de flujo tangencial al usar una membrana de línea de corte de 30 kDa es particularmente adecuada para procedimientos a gran escala.

Se realizan normalmente al menos 5 ciclos de diafiltración por flujo tangencial, por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o más.

El producto de retención de la diafiltración que contiene el polisacárido se recolecta para el almacenamiento y/o el procesamiento adicional.

Cromatografía de intercambio aniónico

35 El polisacárido se puede purificar adicionalmente mediante una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Los inventores han descubierto que la cromatografía de intercambio aniónico es particularmente eficaz en la eliminación de la proteína residual y de la contaminación con ácidos nucleicos, mientras se mantiene un buen rendimiento del polisacárido.

40 La etapa de cromatografía de intercambio aniónico se puede realizar tras las etapas de tratamiento con ácido, tratamiento enzimático y/o diafiltración tratadas anteriormente.

45 La cromatografía de intercambio aniónico se puede llevar a cabo usando cualquier matriz de intercambio aniónico adecuada. Las matrices de intercambio aniónico comúnmente usadas son resinas tales como las resinas Q (basadas en aminas cuaternarias) y resinas DEAE (basadas en dietilaminoetano). Los inventores han descubierto que las resinas DEAE (por ejemplo, una resina de flujo rápido DEAE-Sepharose™ (GE Healthcare)) son particularmente adecuadas, aunque se pueden usar otras resinas.

50 Los tampones de partida apropiados y los tampones en fase móvil para la cromatografía de intercambio de aniones también se pueden determinar mediante experimentos habituales sin carga indebida. Los tampones típicos para su uso en la cromatografía de intercambio aniónico incluyen N-metil piperazina, piperazina, L-histidina, bis-Tris, bis-Tris propano, trietanolamina, Tris, N-metil-dietanolamina, dietanolamina, 1,3-diaminopropano, etanolamina, piperidina, cloruro de sodio y tampones de fosfato. Los inventores han descubierto que los tampones de fosfato, por ejemplo, un tampón de fosfato de sodio, son adecuados como la tampón de partida para la cromatografía de intercambio aniónico. El tampón puede estar en cualquier concentración adecuada. Por ejemplo, se ha descubierto que el fosfato de sodio 10 mM es adecuado. El material unido a la resina de intercambio aniónico se puede eluir con un tampón adecuado. Los inventores han descubierto que es adecuado un gradiente de NaCl 1 M.

55 Las fracciones de eluato que contienen polisacárido se pueden determinar midiendo la absorción UV a 215 nm. Las

fracciones que contienen polisacárido, normalmente al combinarse juntas, se recolectan para el almacenamiento y/o el procesamiento adicional.

La etapa de cromatografía de intercambio aniónico se puede repetir, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 veces. Típicamente la etapa de cromatografía de intercambio aniónico se lleva a cabo una vez.

5 **Filtración con gel**

El procedimiento de la invención puede implicar una o más etapa(s) de filtración con gel. Esta filtración con gel se usa para seleccionar moléculas de polisacárido de una longitud en particular, y para reducir adicionalmente la contaminación, particularmente por proteínas. Sin embargo, los inventores han descubierto que al contrario de los procedimientos previos como aquellos de las referencias 1 a 9, una etapa de filtración con gel no se requiere para obtener polisacárido de alta pureza. Por lo tanto, esta etapa se puede omitir de los procedimientos de la invención. La omisión de esta etapa es ventajosa debido a que simplifica el procedimiento y reduce el coste global.

Cuando está presente, la(s) etapa(s) de filtración con gel se puede realizar tras las etapas de tratamiento con ácido, tratamiento enzimático, diafiltración y/o cromatografía de intercambio aniónico tratadas anteriormente. Típicamente, cualquier etapa(s) de filtración con gel se lleva a cabo tras la etapa de cromatografía de intercambio aniónico tratada anteriormente.

La(s) etapa(s) de filtración con gel se puede llevar a cabo usando cualquier matriz para filtración con gel adecuada. Las matrices para filtración con gel comúnmente usadas se basan en geles de dextrano, geles de agarosa, geles de poli(acrilamida), geles de poli(acrililmorfolina) y geles de poliestireno, etc. También se pueden usar geles de dextrano reticulados y geles mixtos de poli(acrilamida/agarosa). Los inventores han descubierto que los geles de dextrano (por ejemplo, un gel Sephacryl™ S300 (GE Healthcare)) son particularmente adecuados, aunque se pueden usar otros geles.

Los tampones en fase móvil apropiados para la filtración con gel se pueden determinar mediante experimentos habituales sin carga indebida. Los tampones típicos para su uso en filtración con gel incluyen N-metil piperazina, piperazina, L-histidina, bis-Tris, bis-Tris propano, trietanolamina, Tris, N-metil-dietanolamina, dietanolamina, 1,3-diaminopropano, etanolamina, piperidina, cloruro de sodio y tampones de fosfato. Por ejemplo, los tampones de cloruro de sodio pueden ser adecuados. El tampón puede estar a cualquier concentración adecuada. Por ejemplo, se puede usar cloruro de sodio 50 mM para la fase móvil.

Las fracciones de eluato que contienen polisacárido se pueden determinar midiendo la absorción UV a 215 nm. Las fracciones que contienen polisacárido, normalmente combinadas juntas, se recolectan para el almacenamiento y/o el procesamiento adicional.

Concentración

Además de, o en lugar de, la una o más etapa(s) de filtración con gel, el procedimiento de la invención puede implicar una o más etapas de concentración del polisacárido. Esta concentración es útil para obtener una muestra de la concentración correcta para cualquier conjugación posterior del polisacárido con una molécula de vehículo, tal como se describe a continuación. Sin embargo, los inventores han descubierto que esta etapa de concentración no se requiere para obtener polisacárido de alta pureza. Por lo tanto, esta etapa se puede omitir de los procedimientos de la invención.

Cuando está presente, la(s) etapa(s) de concentración se puede(n) realizar tras las etapas de tratamiento con ácido, tratamiento enzimático, diafiltración, cromatografía de intercambio aniónico y/o filtración con gel tratadas anteriormente. Típicamente, cualquier etapa(s) de concentración se lleva a cabo tras la etapa de cromatografía de intercambio aniónico tratada anteriormente. Si se usa además de la(s) etapa(s) de filtración con gel tratada anteriormente, la(s) etapa(s) de concentración se puede llevar a cabo antes o después de la(s) etapa(s) de filtración con gel tratada anteriormente. Sin embargo, típicamente, la(s) etapa(s) de concentración se usan en lugar de la(s) etapa(s) de filtración con gel.

La(s) etapa(s) de concentración se pueden llevar a cabo mediante cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, los inventores han descubierto que la(s) etapa(s) de concentración puede(n) ser etapa(s) de diafiltración tal como se describen anteriormente, por ejemplo, filtración de flujo tangencial usando una membrana de línea de corte de 30 kDa. Como ejemplo, se puede usar una membrana Hydrosart™ (Sartorius) de línea de corte de 30kDa (con un área de membrana de 200 cm²).

La muestra de polisacárido concentrada se recolecta para almacenamiento y/o procesamiento adicional.

Tratamiento adicional del polisacárido capsular

Tras la purificación, el polisacárido se puede tratar adicionalmente para eliminar contaminantes. Esto es particularmente importante en situaciones en las que incluso no es aceptable una contaminación menor (por ejemplo, para la producción de vacunas humanas).

La masa molecular del polisacárido capsular purificado de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8 se puede medir mediante filtración con gel en relación con los estándares de pululano, tales como aquellos disponibles del Servicio Estándar de Polímeros [28]. Típicamente, el polisacárido purificado es una mezcla de polisacáridos con masas dentro de un intervalo de valores. Para el polisacárido capsular de tipo 5, la masa molecular del polisacárido purificado típicamente está entre 2-3500 kDa, por ejemplo, entre 10-2000 kDa, particularmente entre 20-1000 kDa y más particularmente entre 100-600 kDa. De manera similar, para el polisacárido capsular de tipo 8, la masa molecular del polisacárido purificado está entre 2-3500 kDa, por ejemplo, entre 10-2000 kDa, particularmente entre 20-1000 kDa y más particularmente entre 100-600 kDa.

El polisacárido purificado se puede despolimerizar para formar un oligosacárido. Los oligosacáridos pueden ser preferentes para su uso en vacunas. La despolimerización a oligosacárido puede tener lugar antes o después de cualquiera de las etapas mencionadas anteriormente. Típicamente, la despolimerización tiene lugar tras la cromatografía de intercambio aniónico descrita anteriormente. Si se concentra el polisacárido tras esta cromatografía, entonces la despolimerización típicamente tiene lugar tras esta concentración. Cuando la composición de la invención incluye un polisacárido despolimerizado, es preferente que la despolimerización preceda a cualquier conjugación. Los polisacáridos de longitud completa se pueden despolimerizar para dar fragmentos más cortos para su uso en la invención mediante diversos procedimientos. Preferentemente, se usa el procedimiento descrito en la referencia 29. Como alternativa, se pueden usar otros procedimientos para la despolimerización del polisacárido. Por ejemplo, el polisacárido se puede calentar o someter a microfluidización [30] o radiación de ultrasonido [3]. Como alternativa, se puede usar la despolimerización por oxidación-reducción [31] u ozonólisis [32].

Los oligosacáridos se pueden identificar mediante cromatografía, por ejemplo, cromatografía por exclusión de tamaño. Los productos se pueden dimensionar con objeto de eliminar oligosacáridos de longitud corta. Esto se puede lograr de diversas maneras, tales como filtración con gel. Las masas moleculares específicas se pueden medir por filtración con gel en relación con patrones de pululano, tales como aquellos disponibles del Servicio Estándar de Polímeros [33].

Si los grupos N-acetilo en el polisacárido capsular natural han sido de-N-acetilados, entonces los procedimientos de la invención pueden incluir una etapa de re-N-acetilación. La re-N-acetilación controlada se puede realizar de manera conveniente usando un reactivo tal como anhídrido acético (CH₃CO)₂O por ejemplo, en bicarbonato de amonio al 5 % [34].

También se pueden realizar rondas adicionales de filtración, por ejemplo, filtración estéril.

Estas etapas adicionales se pueden realizar generalmente a temperatura ambiente.

Almacenamiento

La preparación del polisacárido capsular de *S. aureus* de tipo 5 o de tipo 8 se puede liofilizar, por ejemplo, mediante secado por congelación al vacío, o congelación en solución (por ejemplo, como el eluato de la etapa final de concentración, si se incluye) para el almacenamiento en cualquier etapa durante el procedimiento de purificación. Por lo tanto, no es necesario para la preparación que se transfiera inmediatamente de una etapa del procedimiento a otra. Por ejemplo, si se va a purificar la preparación de polisacáridos mediante diafiltración, entonces se puede liofilizar o congelar en solución antes de esta purificación. De manera similar, el polisacárido se puede liofilizar o congelar en solución antes de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Si la preparación de polisacáridos se va a purificar mediante filtración con gel, entonces se puede liofilizar o congelar en solución antes de esta etapa. De manera similar, si se va a concentrar la preparación de polisacáridos, entonces se puede liofilizar o congelar en solución antes de esta etapa. La preparación liofilizada se reconstituye en una solución apropiada antes del tratamiento adicional. De manera similar, la solución congelada se descongela antes del tratamiento adicional.

El polisacárido purificado obtenido mediante el procedimiento de la invención se puede procesar para el almacenamiento de cualquier forma adecuada. Por ejemplo, el polisacárido se puede liofilizar tal como se describe anteriormente. Como alternativa, el polisacárido se puede almacenar en solución acuosa, típicamente a baja temperatura, por ejemplo, a 20 °C. Convenientemente, el polisacárido se puede almacenar como el eluato de las etapas de cromatografía de intercambio aniónico, filtración con gel o concentración.

Conjugación

El polisacárido capsular purificado final de la invención se puede usar como un antígeno sin modificación adicional, por ejemplo, para su uso en ensayos de diagnóstico in vitro, para su uso en inmunización, etc.

Para propósitos de inmunización, sin embargo, es preferente conjugar el polisacárido con una molécula de vehículo, tal como una proteína. En general, la conjugación covalente de polisacáridos con los vehículos mejora la inmunogenicidad de los polisacáridos ya que los convierte de antígenos T-independientes a antígenos T-dependientes, permitiendo, por lo tanto, cebar la memoria inmunológica. La conjugación es especialmente útil para vacunas pediátricas [por ejemplo, ref. 35] y es una técnica bien conocida [por ejemplo, revisada en las refs. 36 a 44]. Por lo tanto, los procedimientos de la invención pueden incluir la etapa adicional de conjugar el polisacárido

purificado con una molécula de vehículo.

La conjugación de polisacáridos capsulares de *S.aureus* de tipo 5 y de tipo 8 se ha publicado ampliamente por ejemplo, ver referencias 1 a 9. El procedimiento típico usado en la literatura para la conjugación implica la tiolación de un polisacárido purificado usando cistamina. La reacción se basa en la presencia de grupos carboxilato en el polisacárido capsular. Estos grupos reaccionan con cistamina en presencia de una carbodiimida, por ejemplo, EDAC. El polisacárido derivado después se conjuga con una proteína de vehículo tal como la endotoxina A (ETA) de *Pseudomonas aeruginosa*, típicamente mediante un enlazador [2]. Las vacunas de conjugados preparadas de este modo, han demostrado ser seguras e inmunogénicas en seres humanos [5]. Otros investigadores han llevado a cabo la conjugación de los polisacáridos capsulares purificados de tipo 5 y de tipo 8 mediante aminación reductora [45 y 12]; acoplamiento con glutaraldehído [45]; o reacción de los grupos hidroxilo en los polisacáridos con agentes de cianilación como CDAP [46] o tricloruro cianúrico [11]. Preferentemente, se usa el procedimiento descrito en la referencia 29.

Las proteínas de vehículos preferentes son toxinas bacterianas, tales como toxinas de la difteria o tétanos, o toxoides o mutantes de las mismas. Los inventores han descubierto que es adecuado el mutante de la toxina de la difteria CRM197 [47]. La exotoxina A (ETA) de *Pseudomonas aeruginosa* y su exoproteína A recombinante (rEPA) mutante no tóxica se han usado como proteínas de vehículos para polisacáridos capsulares de *S.aureus* de tipo 5 o de tipo 8 ([1] y [2]). La α -hemolisina de *S.aureus* (α -toxina) ([45] y [48]), la ovoalbúmina [11] y la albúmina de suero humana [12] también se han usado. Estos vehículos se pueden usar en la presente invención.

Otras proteínas de vehículos adecuadas incluyen el complejo de proteína de membrana exterior de *N.meningitidis* [49], péptidos sintéticos [50, 51], proteínas de choque térmico [52, 53], proteínas de tosferina [54, 55], citocinas [56], linfocinas [56], hormonas [56], factores de crecimiento [56], albúmina de suero humana (típicamente recombinante), proteínas artificiales que comprenden epítomos múltiples de linfocitos T CD4+ humanos a partir de diversos antígenos derivados de patógenos [57] tales como N19 [58], proteína D de *H.influenzae* [59-61], proteína PspA de superficie de neumococos [62], neumolisina [63] o sus derivados no tóxicos [64], proteínas de absorción de hierro [65], toxina A o B de *C.difficile* [66], una proteína GBS [67], una proteína GAS [68] etc.

Otras proteínas de vehículos adecuadas incluyen antígenos de proteínas de *S.aureus*, por ejemplo los antígenos de proteínas de *S.aureus* que se indican a continuación.

La unión al vehículo es preferentemente mediante un grupo $-NH_2$ por ejemplo, en la cadena lateral de un resto de lisina en una proteína de vehículo, o de un resto de arginina. La unión también puede ser mediante un grupo $-SH$ por ejemplo, en la cadena lateral de un resto de cisteína.

Es posible usar más de una proteína de vehículo, por ejemplo, para reducir el riesgo de supresión del vehículo. Por lo tanto, se pueden usar diferentes proteínas de vehículos para los polisacáridos capsulares de tipo 5 y de tipo 8, por ejemplo, el polisacárido de tipo 5 podría conjugarse con CRM197 mientras que el polisacárido de tipo 8 podría conjugarse con rEPA. También es posible usar más de una proteína de vehículo para un antígeno de polisacárido particular, por ejemplo, el polisacárido tipo 5 podría estar en dos grupos, con un grupo conjugado con CRM197 y el otro conjugado con rEPA. Típicamente, sin embargo, la misma proteína de vehículo se usa para todos los polisacáridos.

Una única proteína de vehículo podría llevar más de un antígeno de polisacárido [69, 70]. Por ejemplo, una única proteína de vehículo podría tener conjugada con ella los polisacáridos capsulares de tipo 5 y de tipo 8. Para alcanzar esta meta, se pueden mezclar diferentes polisacáridos antes del procedimiento de conjugación. Típicamente, sin embargo, existen conjugados separados para cada polisacárido, con los diferentes polisacáridos que se mezclan tras la conjugación. Los conjugados separados se pueden basar en el mismo vehículo.

Los conjugados con una proporción polisacárido:proteína (p/p) de entre 1:20 (es decir, proteína en exceso) y 20:1 (es decir, polisacárido en exceso) se usan típicamente. Las proporciones de 1:10 a 1:1 son preferentes, particularmente las proporciones entre 1:5 y 1:2 y, lo más preferentemente, alrededor de 1:3. En contraste, los conjugados del polisacárido capsular de tipo 5 y de tipo 8 usados en la bibliografía tienden a tener proporciones mayores, por ejemplo, entre 0,73 y 1,08 en las referencias 1, 2 y 3. En realizaciones particulares de la invención, la proporción polisacárido:proteína (p/p) para el conjugado del polisacárido capsular de tipo 5 está entre 1:10 y 1:2; y/o la proporción polisacárido:proteína (p/p) para el conjugado del polisacárido capsular de tipo 8 está entre 1:5 y 7:10.

Los conjugados se pueden usar en conjunto con un vehículo libre [71]. Cuando una proteína de vehículo dada está presente tanto en forma libre como conjugada en una composición de la invención, la forma no conjugada es preferentemente no más del 5 % de la cantidad total de la proteína de vehículo en la composición como un todo, y más preferiblemente presente a menos del 2 % en peso.

Tras la conjugación, se pueden separar los polisacáridos libres y conjugados. Existen muchos procedimientos adecuados, incluyendo cromatografía hidrofóbica, ultrafiltración tangencial, diafiltración etc. [ver también las refs. 72 y 73, etc.].

Combinaciones de los conjugados y otros antígenos

Los procedimientos de la invención son para preparar una composición inmunogénica que comprende un polisacárido capsular de *S. aureus* conjugado con una molécula de vehículo y un polisacárido capsular de tipo 8 de *S. aureus* conjugado con una molécula de vehículo.

- 5 Los polisacáridos preparados mediante los procedimientos tal como se desvelan en el presente documento (en particular tras la conjugación tal como se describe anteriormente) se pueden mezclar por ejemplo, entre sí y/o con otros antígenos. Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden incluir la etapa adicional de mezclar el polisacárido con uno o más antígenos adicionales. Los inventores desvelan una composición que comprende un polisacárido preparado mediante el procedimiento tal como se desvela y uno o más antígenos adicionales. La composición es típicamente una composición inmunogénica.

- 10 El(los) antígeno(s) adicional(es) puede(n) comprender adicionalmente polisacáridos preparados mediante los procedimientos desvelados, y por tanto, también se desvela una composición que comprende más de un polisacárido tal como se desvela. En particular, la presente invención proporciona una composición que comprende un polisacárido capsular de tipo 5 de la invención y un polisacárido capsular de tipo 8 de la invención. Los inventores desvelan que, el(los) antígeno(s) adicional(es) puede(n) ser polisacáridos capsulares de tipo 5 o de tipo 8 preparados mediante procedimientos diferentes a aquellos desvelados en el presente documento, por ejemplo, los procedimientos de las referencias 1 a 18 anteriores. Por lo tanto, los inventores desvelan una composición que comprende un polisacárido capsular de tipo 5 y un polisacárido capsular de tipo 8, en la que uno de los polisacáridos (el polisacárido de tipo 5 o el polisacárido de tipo 8) es un polisacárido tal como el que se desvela y el otro polisacárido no es un polisacárido tal como el que se desvela.

Cuando se mezclan los múltiples conjugados diferentes de *S.aureus*, entonces estos pueden incluir diferentes tipos de conjugado del mismo serotipo *S.aureus* y/o los conjugados de diferentes serotipos de *S.aureus*. Por ejemplo, los conjugados pueden ser de *S.aureus* de tipo 5 y de tipo 8. La composición se producirá preparando los conjugados separados (por ejemplo, un conjugado diferente para cada serotipo) y después combinando los conjugados.

- 25 El(los) antígeno(s) adicional(es) puede(n) comprender otros antígenos de *S.aureus*, incluyendo el sacárido y los antígenos de proteínas indicados a continuación.

- El (los) antígeno(s) adicional(es) puede(n) comprender antígenos de patógenos que no son *S.aureus*. Por lo tanto, las composiciones desveladas y la composición de la invención pueden comprender además uno o más antígenos que no son de *S.aureus*, incluyendo antígenos bacterianos, víricos o de parásitos adicionales. Estos se pueden seleccionar de los siguientes:

- un antígeno de proteínas del serogrupo B de *N.meningitidis*, tal como aquellos en las refs. 74 a 80, con la proteína '287' (véase a continuación) y derivados (por ejemplo, 'ΔG287') que son particularmente preferentes.
- una preparación de vesícula de membrana exterior (OMV, del inglés *outer-membrane vesicle*) del serogrupo B de *N.meningitidis*, tales como aquellas desveladas en las refs. 81, 82, 83, 84 etc.
- 35 – un antígeno de sacárido del serogrupo A, C, W135 y/o Y, de *N.meningitidis*, tal como el oligosacárido desvelado en la ref. 85 del serogrupo C o los oligosacáridos de la ref. 86.
- un antígeno de sacárido de *Streptococcus pneumoniae* [por ejemplo, refs. 87-89; capítulos 22 y 23 de la ref. 96].
- un antígeno de virus de hepatitis A, tal como virus inactivo [por ejemplo, 90, 91; capítulo 15 de la ref. 96].
- un antígeno de virus de hepatitis B, tales como los antígenos de superficie y/o de núcleo [por ejemplo, 91, 92; capítulo 16 de la ref. 96].
- 40 – un antígeno de virus de hepatitis C [por ejemplo, 93].
- un antígeno de *Bordetella pertussis*, tal como holotoxina de la tosferina (PT, del inglés *pertussis holotoxin*) y hemaglutinina filamentosa (FHA, del inglés *filamentous haemagglutinin*) de *Bordetella pertussis*, opcionalmente también en combinación con pertactina y/o aglutinógenos 2 y 3 [por ejemplo, refs. 94 y 95; capítulo 21 de la ref. 96].
- 45 – un antígeno de la difteria, tal como toxoide de difteria [por ejemplo, capítulo 13 de la ref. 96].
- un antígeno del tétanos, tal como toxoide tetánico [por ejemplo, capítulo 27 de la ref. 96].
- un antígeno de sacárido de *Haemophilus influenzae* B [por ejemplo, capítulo 14 de la ref. 96]
- un antígeno de *N.gonorrhoeae* [por ejemplo, 74, 75, 76].
- 50 – un antígeno de *Chlamydia pneumoniae* [por ejemplo, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103].
- un antígeno de *Chlamydia trachomatis* [por ejemplo, 104].
- un antígeno de *Porphyromonas gingivalis* [por ejemplo, 105].
- antígeno(s) de la polio [por ejemplo, 106, 107; capítulo 24 de la ref. 96] tal como IPV.
- antígeno(s) de la rabia [por ejemplo, 108] tal como virus inactivo liofilizado [por ejemplo, 109, RabAvert™].
- 55 – antígenos del sarampión, paperas y/o rubeola [por ejemplo, capítulos 19, 20 y 26 de la ref. 96].
- antígeno(s) de la gripe [por ejemplo, capítulos 17 y 18 de la ref. 96], tales como proteínas de superficie de hemaglutinina y/o neuraminidasa.
- un antígeno de *Moraxella catarrhalis* [por ejemplo, 110].
- un antígeno de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) [por ejemplo, 111, 112, 113].
- 60 – un antígeno de *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B) [por ejemplo, 68, 114-116].

- un antígeno de *S.epidermidis* [por ejemplo, polisacárido capsular tipo I, II y/o III que se obtiene a partir de las cepas ATCC-31432, SE-360 y SE-10 tal como se describe en refs. 117, 118 y 119.

5 Cuando se usa un sacárido o antígeno de carbohidrato, se conjuga preferentemente con un vehículo con el fin de potenciar la inmunogenicidad. Es bien conocida la conjugación de antígenos de sacáridos de meningococos y neumococos de *H.influenzae* B.

Los antígenos tóxicos de proteínas se pueden destoxificar donde sea necesario (por ejemplo, destoxificación de la toxina de tosferina por medios químicos y/o genéticos [95]).

10 Cuando se incluye un antígeno de la difteria en la composición es preferente también que incluya antígeno del tétanos y antígenos de la tosferina. De manera similar, cuando se incluye un antígeno del tétanos es preferente también que incluya antígenos de difteria y tosferina. De manera similar, cuando se incluye un antígeno de la tosferina se prefiere también que incluya antígenos del tétanos y la difteria.

Los antígenos se pueden adsorber en una sal de aluminio.

15 Un tipo de composición preferente incluye antígenos adicionales que afectan al inmunocomprometido, y por tanto los polisacáridos de *S.aureus* de la invención se pueden combinar con uno o más antígenos de los siguientes patógenos que no son de *S.aureus*: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus epidermis*, virus de la gripe, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomononas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, y virus de paragripe.

20 Otro tipo de composición preferente incluye antígenos adicionales de bacterias asociadas con infecciones hospitalarias y, por tanto, los polisacáridos de *S.aureus* de la invención se pueden combinar con uno o más antígenos de los siguientes patógenos que no son de *S.aureus*: *Clostridium difficile*, *Pseudomononas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Escherichia coli* patogénica extraintestinal.

Los antígenos en la composición estarán presentes típicamente a una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para producir una respuesta inmunitaria contra ese antígeno.

25 Como una alternativa al uso de antígenos de proteínas en la composición de la invención, se puede usar el ácido nucleico que codifica el antígeno [por ejemplo, refs. 120 a 128]. Los componentes de proteínas de las composiciones de la invención pueden reemplazarse de este modo por ácido nucleico (preferiblemente ADN por ejemplo, en la forma de un plásmido) que codifique la proteína.

30 En términos prácticos, puede haber un límite superior al número de antígenos incluidos en las composiciones de la invención. El número de antígenos (incluyendo antígenos de *S.aureus*) en una composición de la invención puede ser menor de 20, menor de 19, menor de 18, menor de 17, menor de 16, menor de 15, menor de 14, menor de 13, menor de 12, menor de 11, menor de 10, menor de 9, menor de 8, menor de 7, menor de 6, menor de 5, menor de 4, o menor de 3. El número de antígenos de *S.aureus* en una composición de la invención puede ser menor de 6, menor de 5, o menor de 4.

35 **Composiciones y procedimientos farmacéuticos**

Los inventores desvelan procedimientos para la preparación de composiciones farmacéuticas, que comprenden las etapas de mezclar (a) un polisacárido desvelado en el presente documento (opcionalmente en la forma de un conjugado) con (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los procesos de la invención son para preparar composiciones inmunogénicas. Los 'vehículos farmacéuticamente aceptables' típicos incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son típicamente macromoléculas grandes, lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, lactosa, y agregados de lípidos (tales como gotas de aceite o liposomas). Tales vehículos son bien conocidos por aquellos expertos en la materia. Las vacunas también pueden contener diluyentes, tales como agua, solución salina, glicerol, etc. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH, y similares. La solución salina fisiológica tamponada con fosfato, libre de pirógenos estéril es un vehículo típico. Un análisis completo de los excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en la referencia 129.

50 Las composiciones de la invención y tal como las que se desvelan en el presente documento pueden estar en forma acuosa (es decir, soluciones o suspensiones) o en una forma seca (por ejemplo, liofilizada). Si se usa una vacuna seca, entonces se reconstituirá en un medio líquido antes de la inyección. La liofilización de las vacunas conjugadas se conoce en la técnica, por ejemplo, el producto Menjugate™ se presenta en forma liofilizada, mientras que NeisVac-C™ y Meningitec™ se presentan en forma acuosa. Para estabilizar los conjugados durante la liofilización, puede ser típico incluir un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol) o un disacárido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa) por ejemplo, a entre 1 mg/ml y 30 mg/ml (por ejemplo, alrededor de 25 mg/ml) en la composición.

Las composiciones farmacéuticas se pueden empaquetar en viales o en jeringas. Las jeringas se pueden suministrar con o sin agujas. Una jeringa incluirá una única dosis de la composición, mientras que un vial puede incluir una única dosis o múltiples dosis.

5 Las composiciones acuosas de polisacáridos de la invención o tal como se desvela en el presente documento son adecuadas para reconstituir otras vacunas a partir de una forma liofilizada. Cuando se va a usar una composición de la invención o tal como la que se desvela en el presente documento para tal reconstitución extemporánea, se proporciona o desvela un procedimiento para reconstituir tal vacuna liofilizada, que comprende la etapa de mezclar el material liofilizado con una composición acuosa de la invención. El material reconstituido se puede usar para inyección.

10 **Antígenos de *S.aureus***

Tal como se mencionó anteriormente, se pueden incluir uno o más antígenos de *S.aureus* adicionales en las composiciones de la invención o tal como las que se desvelan. Los antígenos pueden ser antígenos de sacáridos o proteínas. Los antígenos de proteínas de *S.aureus* se pueden usar como proteínas de vehículos para los conjugados de la invención o tal como se desvela, proteínas de vehículos para otros conjugados, o como antígenos de proteínas no conjugadas. Los antígenos de sacáridos de *S.aureus* se pueden usar como los sacáridos para otros conjugados o como antígenos de sacáridos no conjugados.

15 Los antígenos de sacáridos de *S.aureus* adecuados incluyen el exopolisacárido de *S.aureus*, el cual es una poli-N-acetilglucosamina (PNAG). Este polisacárido está presente tanto en *S.aureus* como en *S.epidermidis* y se puede aislar de cualquier fuente [130, 131]. Por ejemplo, se puede aislar la PNAG de la cepa de *S.aureus* MN8m [132]. El antígeno de sacárido puede ser un polisacárido que tiene el tamaño que surge durante la purificación del exopolisacárido a partir de bacterias, o puede ser un polisacárido logrado por fragmentación de tal polisacárido por ejemplo, el tamaño puede variar de más de 400 kDa hasta entre 75 y 400 kDa, o entre 10 y 75 kDa, o hasta 30 unidades de repetición. El antígeno de sacárido puede tener diversos grados de N-acetilación y, tal como se describe en la referencia 133, la PNAG puede estar N-acetilada a menos del 40 % (por ejemplo, N-acetilada a menos del 35, 30, 20, 15, 10 o 5 %; la PNAG deacetilada también se conoce como dPNAG). Los epítomos deacetilados de PNAG pueden producir anticuerpos que sean capaces de mediar la eliminación por opsonización. La preparación de dPNAG se describe en la referencia 134. El PNAG puede o no estar O-succinilado por ejemplo, puede estar O-succinilado en menos del 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 o 0,1 % de restos. El PNAG se puede conjugar con una molécula de vehículo tal como se describe anteriormente o como alternativa puede no conjugarse.

30 Otro antígeno de sacárido de *S.aureus* adecuado es el antígeno tipo 336, el cual es una hexosamina ligada a β sin O-acetilación [135, 136]. El antígeno tipo 336 tiene reacción cruzada con anticuerpos contra la cepa 336 (ATCC 55804). El antígeno tipo 336 se puede conjugar con una molécula de vehículo tal como se describe anteriormente o como alternativa puede no conjugarse.

35 Los antígenos de proteínas de *S.aureus* adecuados incluyen los siguientes antígenos de *S.aureus* (o antígenos que comprenden fragmentos inmunogénicos de los mismos) [por ejemplo, véase las referencias 137-144]: AhpC, AhpF, autolisina, autolisina, autolisina, autolisina, proteína de unión a colágenoCAN, EhbB, GehD lipasa, proteína de unión a heparina HBP (17 kDa), receptor de laminina, MAP, MntC (también conocido como SitC), MRPII, Npasa, ORF0594, ORF0657n, ORF0826, PBP4, RAP (proteína activadora de RNA III), Sai-1, SasK, SBI, SdrG, SdrH, SSP-1, SSP-2 y proteína de unión a vitronectina.

40 Los antígenos de proteínas de *S.aureus* adicionales adecuados incluyen un antígeno clfA; un antígeno clfB; un antígeno sdrE2; un antígeno sdrC; un antígeno sasF, un antígeno emp; un antígeno sdrD; un antígeno spa; un antígeno esaC; un antígeno esxA; un antígeno esxB; un antígeno sta006; un antígeno isdC; un antígeno Hla; un antígeno sta011; un antígeno isdA; un antígeno isdB; y un antígeno sta073, tal como se describe a continuación. Uno o más (es decir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) de estos antígenos puede estar presente en una composición de la invención. De estos antígenos, el uso de uno o más (es decir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más) de un antígeno esxA; un antígeno esxB; un antígeno sta006; un antígeno Hla; un antígeno sta011; y/o un antígeno sta073 está específicamente previsto.

Por ejemplo, una composición de la invención puede comprender una de las siguientes combinaciones de antígenos de proteínas de *S.aureus*:

- 50 (1) Un antígeno esxA, un antígeno esxB, un antígeno sta006 y un antígeno Hla. Los antígenos esxA y esxB se pueden combinar de manera útil como un polipéptido híbrido, tal como se trata a continuación, por ejemplo, un híbrido EsxAB con un antígeno esxB aguas abajo de un antígeno esxA. El antígeno Hla puede ser un mutante destoxificado por ejemplo, que incluye una mutación H35L.
- 55 (2) Un antígeno esxA, un antígeno esxB, un antígeno sta006 y un antígeno sta011. Los antígenos esxA y esxB pueden combinarse como un polipéptido híbrido, tal como se trata a continuación, por ejemplo, un híbrido EsxAB.
- (3) Un antígeno esxA, un antígeno esxB y un antígeno sta011. Los antígenos esxA y esxB se pueden combinar útilmente como un polipéptido híbrido, tal como se trata a continuación, por ejemplo, un híbrido EsxAB.
- (4) Un antígeno esxA, un antígeno esxB, un antígeno Hla, un antígeno sta006 y un antígeno sta011. Los

antígenos esxA y esxB pueden combinarse como un polipéptido híbrido, tal como se trata a continuación, por ejemplo, un híbrido EsxAB. El antígeno Hla puede ser un mutante destoxificado por ejemplo, que incluye una mutación H35L.

5 (5) Un antígeno esxA, un antígeno esxB y un antígeno Hla. Los antígenos esxA y esxB se pueden combinar de manera útil como un polipéptido híbrido, tal como se trata a continuación, por ejemplo, un híbrido EsxAB. El antígeno Hla puede ser un mutante destoxificado por ejemplo, que incluye una mutación H35L.

(6) Un antígeno Hla, un antígeno sta006 y un antígeno sta011. El antígeno Hla puede ser un mutante destoxificado por ejemplo, que incluye una mutación H35L.

10 (7) Un antígeno esxA y un antígeno esxB. Los antígenos esxA y esxB se pueden combinar de manera útil como un polipéptido híbrido, tal como se discute a continuación, por ejemplo, un híbrido EsxAB.

(8) Un antígeno esxA, un antígeno esxB y un antígeno sta006. Los antígenos esxA y esxB se pueden combinar de manera útil como un polipéptido híbrido, tal como se trata a continuación, por ejemplo, un híbrido EsxAB.

15 (9) Un antígeno esxA, un antígeno esxB, un antígeno sta011 y un antígeno sta073. Los antígenos esxA y esxB se pueden combinar como un polipéptido híbrido, tal como se trata a continuación, por ejemplo, un híbrido EsxAB.

(10) Un antígeno sta006 y un antígeno sta011.

Antígenos adicionales de *Staphylococcus aureus* se desvelan en la referencia 145.

clfA

20 El antígeno 'clfA' se señala como 'factor de agregación A'. En la cepa NCTC 8325, clfA es SAOUHSC_00812 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 (GI:88194572). En la cepa Newman es nwmn_0756 (GI:151220968).

25 Los antígenos clfA útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 1 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 1; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas clfA incluyen variantes de la SEQ ID NO: 1. Los fragmentos preferentes de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 1. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 1 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 1. Los 368 aminoácidos finales del extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 1 se pueden omitir de manera útil. Los primeros 39 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 1 se pueden omitir de manera útil. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas.

30 La SEQ ID NO: 2 es un fragmento útil de la SEQ ID NO: 1 ('ClfA₄₀₋₅₅₉'). Este fragmento omite la región repetitiva larga hacia el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 1.

35 clfB

El antígeno 'clfB' se señala como 'factor de agregación B'. En la cepa NCTC 8325, clfB es SAOUHSC_02963 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 (GI:88196585). En la cepa Newman es nwmn_2529 (GI:151222741).

40 Los antígenos clfB útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 3 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 3; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas clfB incluyen variantes de la SEQ ID NO: 3. Los fragmentos preferentes de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 3. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 3 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 3. Los 40 aminoácidos finales en el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 3 se pueden omitir de manera útil. Los primeros 44 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 3 se pueden omitir de manera útil. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas. ClfB es naturalmente una proteína larga y por tanto, el uso de fragmentos es útil por ejemplo, para purificación, manejo, fusión, expresión, etc.

50 La SEQ ID NO: 4 es un fragmento útil de la SEQ ID NO: 3 ('ClfB₄₅₋₅₅₂'). Este fragmento incluye el dominio más expuesto de ClfB y se usa más fácilmente a escala industrial. También reduce la similitud del antígeno con proteínas humanas. Otros fragmentos útiles, basados en un modelo de 3 dominios de ClfB, incluyen: ClfB₄₅₋₃₆₀ (también conocido como CLFB-N12; SEQ ID NO: 5); ClfB₂₁₂₋₅₄₂ (también conocido como CLFB N23; SEQ ID NO: 6); y ClfB₃₆₀₋₅₄₂ (también conocido como CLFB N3; SEQ ID NO: 7).

sdrE2

El antígeno 'sdrE2' se señala como un proteína SdrE de unión a sialoproteínas de fibrinógeno/hueso ricas en Ser-Asp'. En la cepa Newman sdrE2 es NWMN_0525 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8 (GI:151220737).

5 Los antígenos sdrE2 útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administra a un humano) que reconoce la SEQ ID NO: 8 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 8; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 8, la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas sdrE2 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 8. Los fragmentos preferentes de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 8. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 8 mientras conserva al menos un epítipo de SEQ ID NO: 8. Los 38 aminoácidos finales en el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 8 se pueden omitir de manera útil. Los primeros 52 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 8 se pueden omitir de manera útil. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas. SdrE2 es naturalmente una proteína larga y por tanto es muy útil el uso de fragmentos por ejemplo, para purificación, manejo, fusión, expresión, etc.

20 La SEQ ID NO: 9 es un fragmento útil de la SEQ ID NO: 8 ('SdrE53-632'). Este fragmento incluye el dominio más expuesto de SdrE2 y se usa más fácilmente a una escala industrial. También reduce la similitud del antígeno con proteínas humanas.

sdrC

El antígeno 'sdrC' se señala como "proteína sdrC". En la cepa NCTC 8325, sdrC es SAOUHSC_00544 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 (GI:88194324).

25 Los antígenos útiles sdrC pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 10 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 10; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 10, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas sdrC incluyen variantes de la SEQ ID NO: 10. Los fragmentos preferentes de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 10. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 10 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 10. Los 38 aminoácidos finales en el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 10 se pueden omitir de manera útil. Los primeros 50 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 10 se pueden omitir de manera útil. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas. SdrC es naturalmente una proteína larga y, por tanto, el uso de fragmentos es útil por ejemplo, para purificación, manejo, fusión, expresión, etc.

40 La SEQ ID NO: 11 es un fragmento útil de la SEQ ID NO: 10 ('SdrC51-518'). Este fragmento incluye el dominio más expuesto de SdrC y se usa más fácilmente a una escala industrial. También reduce la similitud del antígeno con proteínas humanas.

sasF

El antígeno 'sasF' se señala como 'proteína sasF'. En la cepa NCTC 8325, sasF es SAOUHSC_02982 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 (GI:88196601).

45 Los antígenos útiles sasF pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 12 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 12; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 12, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas sasF incluyen variantes de la SEQ ID NO: 12. Los fragmentos preferentes de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 12. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 12 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 12. Los 39 aminoácidos finales en el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 12 se pueden omitir de manera útil. Los primeros 37 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 12 se pueden omitir de manera útil. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas.

emp

El antígeno 'emp' se señala como 'matriz extracelular y proteína de unión a plasma'. En la cepa NCTC 8325, emp es SAOUHSC_00816 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13 (GI:88194575). En la cepa Newman es nwmn_0758 (GI:151220970).

5 Los antígenos útiles emp pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 13 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50% o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 13; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 13, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas emp incluyen variantes de la SEQ ID NO: 13. Los fragmentos preferentes de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 13. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 13 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 13. Los primeros 26 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 13 se pueden omitir de manera útil. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas.

Las SEQ ID NOs: 14, 15, 16 y 17 son fragmentos útiles de la SEQ ID NO: 13 ('Emp₃₅₋₃₄₀', 'Emp₂₇₋₃₃₄', 'Emp₃₅₋₃₃₄' y 'Emp₂₇₋₁₄₇', respectivamente).

sdrD

20 El antígeno 'sdrD' se señala como 'proteína sdrD'. En la cepa NCTC 8325, sdrD es SAOUHSC_00545 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 (GI:88194325).

25 Los antígenos útiles sdrD pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 18 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 18; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 18, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas sdrD incluyen variantes de la SEQ ID NO: 18. Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 18. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 18 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 18. Los 38 aminoácidos finales en el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 18 se pueden omitir de manera útil. Los primeros 52 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 18 se pueden omitir de manera útil. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas. SdrD es naturalmente una proteína larga y así es muy útil el uso de fragmentos por ejemplo, para purificación, manejo, fusión, expresión, etc.

35 La SEQ ID NO: 19 es un fragmento útil de la SEQ ID NO: 18 ('SdrD₅₃₋₅₉₂'). Este fragmento incluye el dominio más expuesto de SdrD y se usa más fácilmente a una escala industrial. También reduce la similitud del antígeno con proteínas humanas. Otro fragmento útil, con el mismo residuo en el extremo C-terminal, es SdrD₃₉₄₋₅₉₂ (también conocido como SdrD-N3; SEQ ID NO: 20).

spa

40 El antígeno 'spa' se señala como 'proteína A' o 'SpA'. En la cepa NCTC 8325, spa es SAOUHSC_00069 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 21 (GI:88193885). En la cepa Newman es nwmn_0055 (GI:151220267). Todas las cepas de *S.aureus* expresan el gen estructural para spa, un factor de virulencia bien caracterizado cuyo producto de proteína de superficie de anclaje a la pared celular tiene cinco dominios de enlace a inmunoglobulina altamente homólogos denominados E, D, A, B, y C [146]. Estos dominios presentan aproximadamente el 80 % de identidad a nivel de aminoácidos, tienen de 56 a 61 residuos de longitud, y están organizados como repeticiones en tándem [147]. SpA se sintetiza como una proteína precursora con un péptido de señal en el extremo N-terminal y una señal de clasificación en el extremo C-terminal [148, 149]. El spa anclado a la pared celular se presenta en mayor abundancia en la superficie del estafilococo [150, 151]. Cada uno de sus dominios de unión a inmunoglobulina está compuesto de hélices α antiparalelas que se ensamblan en un haz de tres hélices y puede unir el dominio Fc de inmunoglobulina G (IgG) [152, 153], la cadena pesada VH3 (Fab) de IgM (es decir, el receptor de linfocito B) [154], el factor von Willebrand en su dominio A1 [155] y/o el receptor I de TNF- α (TNFRI) [156], que se presenta en las superficies del epitelio de las vías respiratorias.

55 Los antígenos spa útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 21 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 21; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 21, en donde 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spa incluyen variantes de la SEQ ID NO: 21. Los

5 fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 21. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 21 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 21. Los 35 aminoácidos finales en el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 21 se pueden omitir de manera útil. Los primeros 36 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 21 se pueden omitir de manera útil. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas. La referencia 157 sugiere que los dominios unidos a IgG pueden ser inmunógenos útiles, solos o en combinación.

10 La SEQ ID NO: 22 es un fragmento útil de la SEQ ID NO: 21 ('Spa37-325'). Este fragmento contiene los cinco dominios de unión a Ig de SpA e incluye el dominio más expuesto de SpA. También reduce la similitud del antígeno con proteínas humanas. Otros fragmentos útiles pueden omitir 1, 2, 3 o 4 de los dominios A, B, C, D y/o E naturales. Tal como se comunica en la referencia 157, otros fragmentos útiles pueden incluir sólo 1, 2, 3 o 4 de los dominios A, B, C, D y/o E naturales por ejemplo, que sólo comprenden el dominio SpA(A) pero no B a E, o sólo comprende el dominio SpA(D) pero no A, B, C o E, etc. Por lo tanto, el antígeno spa útil con la invención puede incluir 1, 2, 3, 4 o 5 dominios de unión a IgG, pero idealmente tiene 4 o menos. Si un antígeno sólo incluye un tipo de dominio spa (por ejemplo, sólo el dominio SpA(A) o SpA(D)), puede incluir más de una copia de este dominio por ejemplo, dominios SpA(D) múltiples en una única cadena de polipéptido. Un dominio individual dentro del antígeno puede mutarse en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos en relación con la SEQ ID NO: 21 (por ejemplo, véase la ref. 157, que desvela mutaciones en los restos 3 y/o 24 del dominio D, en el resto 46 y/o 53 del dominio A, etc.). Tales mutantes no deberían eliminar la capacidad del antígeno para producir un anticuerpo que reconozca la SEQ ID NO: 21, pero pueden eliminar la unión del antígeno a IgG. En ciertos aspectos un antígeno spa incluye una sustitución en (a) una o más sustitución de aminoácido en un sub-dominio unido a IgG Fc del dominio SpA A, B, C, D y/o E que rompe o reduce la unión a IgG Fc, y (b) una o más sustitución de aminoácido en un sub dominio unido a VH3 del dominio SpA A, B, C, D, y/o E que rompe o reduce la unión a VH3. En ciertas realizaciones, una variante de SpA comprende al menos o como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más péptidos D del dominio SpA variante.

esaC

El antígeno 'esaC' se señala como 'esaC'. En la cepa NCTC 8325 esaC es SAOUHSC_00264 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23 (GI:88194069).

30 Los antígenos esaC útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administran a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 23 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 23; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 23, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más). Estas proteínas esaC incluyen variantes de la SEQ ID NO: 23. Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 23. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 23 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 23. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas.

40 esxA

El antígeno 'esxA' se señala como 'proteína'. En la cepa NCTC 8325 esxA es SAOUHSC_00257 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24 (GI:88194063).

45 Los antígenos esxA útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administran a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 24 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 24; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 24, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o más). Estas proteínas esxA incluyen variantes de la SEQ ID NO: 24. Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 24. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 24 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 24. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas.

esxB

55 El antígeno 'esxB' se señala como 'esxB'. En la cepa NCTC 8325 esxB es SAOUHSC_00265 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25 (GI:88194070).

Los antígenos esxB útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administran a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 25 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de

identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 25; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 25, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más). Estas proteínas esxB incluyen variantes de la SEQ ID NO: 25. Los fragmentos preferentes de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 25. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 25 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 25. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas.

10 sta006

El antígeno 'sta006' se señala como 'proteína de unión a ferricromo', y también se ha referido como 'FhuD2' en la bibliografía [158]. En la cepa NCTC 8325 sta006 es SAOUHSC_02554 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 26 (GI:88196199). En la cepa Newman esta es nwmn_2185 (GI:151222397).

15 Los antígenos sta006 útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administran a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 26 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 26; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 26, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas sta006 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 26. Los fragmentos preferentes de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 26. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 26 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 26. Los primeros 17 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 26 se pueden omitir de manera útil. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas. Las formas mutantes de sta006 se comunican en la referencia 159. Un antígeno sta006 puede lipidarse por ejemplo, con una cisteína del extremo N-terminal acilado.

isdC

El antígeno 'isdC' se señala como 'proteína'. En la cepa NCTC 8325 isdC es SAOUHSC_01082 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27 (GI:88194830).

30 Los antígenos isdC útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administran a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 27 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 27; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 27, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 o más). Estas proteínas isdC incluyen variantes de la SEQ ID NO: 27. Los fragmentos preferentes de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 27. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 27 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 27. Los 39 aminoácidos finales en el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 27 se pueden omitir de manera útil. Los primeros 28 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 27 se pueden omitir de manera útil. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas. Los fragmentos útiles de IsdB se desvelan en la referencia 165.

La referencia 160 desvela antígenos que incluyen de manera útil epítopos tanto de IsdB como de IsdH.

Hla

45 El antígeno 'Hla' es el 'precursor alfa-hemolisina' también conocido como 'toxina alfa' o simplemente 'hemolisina'. En la cepa NCTC 8325 Hla es SAOUHSC_01121 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28 (GI:88194865). En la cepa Newman es nwmn_1073 (GI:151221285). Hla es un determinante de virulencia importante producida por la mayoría de las cepas de *S.aureus*, que tiene una actividad hemolítica y que forma poros. Los anticuerpos anti-Hla pueden neutralizar los efectos perjudiciales de la toxina en modelos animales, y Hla es particularmente útil para la protección contra la neumonía.

50 Los antígenos Hla útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 28 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 28; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 28, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas Hla proteínas incluyen variantes de la SEQ ID NO: 28. Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 28. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o

más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 28 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 28. Los primeros 26 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 28 se pueden omitir de manera útil. La truncación en el extremo C-terminal también se puede usar por ejemplo, dejando sólo 50 aminoácidos (restos 27-76 de la SEQ ID NO: 28) [161]. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas.

Se puede evitar la toxicidad de Hla en las composiciones de la invención mediante inactivación química (por ejemplo, usando formaldehído, glutaraldehído u otros reactivos de reticulación). En su lugar, sin embargo, es preferente usar formas mutantes de Hla que eliminan su actividad tóxica mientras mantienen su inmunogenicidad. Tales mutantes destoxificados ya se conocen en la materia. Un antígeno Hla útil tiene una mutación en el resto 61 de la SEQ ID NO: 28, que es el resto 35 del antígeno maduro (es decir tras omitir los primeros 26 aminoácidos del extremo N-terminal). Por tanto, el resto 61 no puede ser histidina, y en su lugar puede ser por ejemplo, Ile, Val o preferentemente Leu. También se puede usar una mutación His-Arg en esta posición. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 29 es la secuencia Hla-H35L mutante madura y un antígeno Hla útil comprende la SEQ ID NO: 29. Otras mutaciones útiles reemplazan un bucle largo con una secuencia corta por ejemplo, para reemplazar el 39mero en los restos 136-174 de la SEQ ID NO: 28 con un tetrámero tal como PSGS (SEQ ID NO: 30), como en la SEQ ID NO: 31 (que también incluye la mutación H35L) y la SEQ ID NO: 32 (que no incluye la mutación H35L).

Los antígenos Hla útiles adicionales se desvelan en las referencias 162 y 163.

Las SEQ ID NOs: 33, 34 y 35 son tres fragmentos útiles de la SEQ ID NO: 28 ('Hla27-76', 'Hla27-89' y 'Hla27-79', respectivamente). Las SEQ ID NOs: 36, 37 y 38 son los fragmentos correspondientes de la SEQ ID NO: 29.

sta011

El antígeno 'sta011' se señala como 'lipoproteína'. En la cepa NCTC 8325 sta011 es SAOUHSC_00052 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 39 (GI:88193872).

Los antígenos sta011 útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administran a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 39 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 39; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 39, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas sta011 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 39. Los fragmentos preferentes de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 39. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 39 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 39. Los primeros 23 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 39 se pueden omitir de manera útil. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas. Un antígeno sta006 puede lipidarse por ejemplo, con una cisteína del extremo N-terminal acilada.

Las formas variantes de la SEQ ID NO: 39 que se pueden usar para preparar antígenos sta011 incluyen, pero no se limitan a las SEQ ID NOs: 40, 41 y 42 con diversas sustituciones Ile/Val/Leu.

isdA

El antígeno 'isdA' se señala como 'proteína IsdA'. En la cepa NCTC 8325 isdA es SAOUHSC_01081 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 43 (GI:88194829). En la cepa Newman es nwmn_1041 (GI:151221253).

Los antígenos isdA útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 43 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 43; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 43, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas isdA incluyen variantes de la SEQ ID NO: 43. Los fragmentos preferidos de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 43. Otros fragmentos preferidos carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 43 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 43. Los 38 aminoácidos finales en el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 43 se pueden omitir de manera útil. Los primeros 46 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 43 se pueden omitir de manera útil. La truncación para excluir el 38mero del extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 43 (que comienza con la porción LPKTG) también son útiles. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas.

La SEQ ID NO: 44 es un fragmento útil de la SEQ ID NO: 43 (aminoácidos 40-184 de la SEQ ID NO: 43; 'IsdA₄₀₋₁₈₄') que incluye el sitio de unión hemo de la proteína natural e incluye el dominio más expuesto del antígeno. También

reduce la similitud del antígeno con proteínas humanas. Otros fragmentos útiles se desvelan en las referencias 164 y 165.

IsdA no adsorbe bien a los adyuvantes de hidróxido de aluminio, de manera que IsdA presente en una composición puede estar no adsorbido o puede adsorberse a un adyuvante alternativo, por ejemplo, a fosfato de aluminio.

5 isdB

El antígeno 'isdB' se señala como 'proteína isdB de neurofilamento'. En la cepa NCTC 8325 isdB es SAOUHSC_01079 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 45 (GI:88194828). IsdB se ha propuesto para su uso como un antígeno de vacuna en sí mismo [166], pero esto puede no prevenir la neumonía.

10 Los antígenos isdB útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 45 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 45; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 45, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas isdB incluyen variantes de la SEQ ID NO: 45. Los fragmentos preferentes de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 45. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 45 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 45. Los 36 aminoácidos finales en el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 45 se pueden omitir de manera útil. Los primeros 40 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 45 se pueden omitir de manera útil. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas. Los fragmentos útiles de IsdB se desvelan en las referencias 165 y 167 por ejemplo, que carecen de los 37 aminoácidos internos de la SEQ ID NO: 45.

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención no incluyen un antígeno isdB.

sta073

25 El antígeno 'sta073' se señala como 'precursor de autolisina bifuncional'. En la cepa NCTC 8325 sta073 es SAOUHSC_00994 y tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 46 (GI:88194750). En la cepa Newman es nwmn_0922 (GI:151221134). El análisis proteómico ha revelado que esta proteína se secreta o se expone en la superficie.

30 Los antígenos sta073 útiles pueden producir un anticuerpo (por ejemplo, cuando se administran a un ser humano) que reconoce la SEQ ID NO: 46 y/o puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene el 50 % o más de identidad (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o más) con la SEQ ID NO: 46; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos "n" aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 46, en la que 'n' es 7 o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas sta073 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 46. Los fragmentos preferentes de (b) comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 46. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) del extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) a partir del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 46 mientras conserva al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 46. Los primeros 24 aminoácidos del extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 46 se pueden omitir de manera útil. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de proteínas.

40 Sta073 no se adsorbe bien a adyuvantes de hidróxido de aluminio, de manera que Sta073 presente en una composición puede no adsorberse o puede adsorberse a un adyuvante alternativo por ejemplo, a un fosfato de aluminio.

Polipéptidos híbridos

45 Los antígenos de proteína de *S.aureus* usados en la invención se pueden presentar en la composición como polipéptidos separados individuales. Cuando se usa más de un antígeno, sin embargo, no se tienen que presentar como polipéptidos separados. En cambio, se pueden expresar al menos dos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más) antígenos como una única cadena de polipéptido (un polipéptido 'híbrido'). Los polipéptidos híbridos ofrecen dos ventajas principales: en primer lugar, un polipéptido que puede ser inestable o mal expresado por sí solo puede ser ayudado al agregar un compañero híbrido apropiado que supera el problema; segundo lugar, la fabricación comercial se simplifica ya que sólo se necesita emplear una expresión y purificación para producir dos polipéptidos que son ambos antigénicamente útiles.

50 El polipéptido híbrido puede comprender dos o más secuencias de polipéptido de cada uno de los antígenos enumerados anteriormente, o dos o más variantes del mismo antígeno en los casos en los que la secuencia tenga cepas de variabilidad cruzada parcial.

55

Los híbridos que consisten en secuencias de aminoácidos de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez antígenos son útiles. En particular, son preferentes los híbridos que consisten en secuencias de aminoácidos de dos, tres, cuatro, o cinco antígenos, tal como dos o tres antígenos.

5 Se pueden mezclar diferentes polipéptidos híbridos juntos en una única formulación. Los híbridos se pueden combinar con antígenos no híbridos seleccionados del primer, segundo o tercer grupo de antígeno. E tales combinaciones, un antígeno se puede presentar en más de un polipéptido híbrido y/o como un polipéptido no híbrido. Es preferente, sin embargo, que un antígeno se presente como un híbrido o como un no híbrido, pero no como ambos.

10 Los polipéptidos híbridos se pueden representar mediante la fórmula $\text{NH}_2\text{-A}\{-\text{X-L}\}_n\text{-B-COOH}$, en la que: X es una secuencia de aminoácidos de un antígeno de *S.aureus*, tal como se describe anteriormente; L es una secuencia de aminoácidos de enlazador opcional; A es una secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal opcional; B es una secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal opcional; n es un número entero de 2 o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, etc.). Normalmente, n es 2 o 3.

15 Si un resto -X- tiene una secuencia de péptido líder en su forma de tipo silvestre, se puede incluir u omitir en la proteína híbrida. En algunas realizaciones, los péptidos líderes se eliminarán excepto para el del resto -X- localizado en el extremo N-terminal de la proteína híbrida, es decir, el péptido líder de X_1 se mantendrá, pero los péptidos líderes de $X_2 \dots X_n$ se omitirán. Esto equivale a eliminar todos los péptidos líderes y usar el péptido líder de X_1 como un resto -A-.

20 Para cada n casos de {-X-L-}, la secuencia de aminoácido enlazadora -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo, cuando n=2 el híbrido puede ser $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-COOH}$, $\text{NH}_2\text{-X}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-COOH}$, etc. Las secuencias de aminoácidos enlazadoras -L- típicamente serán cortas (por ejemplo, 20 o menos aminoácidos, es decir, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos comprenden secuencias de péptido cortas que facilitan la clonación, ligadores poli-glicina (es decir que comprenden Gly_n en los que n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más), y marcadores de histidina (es decir His_n en los que n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Otras secuencias de aminoácidos enlazadoras adecuadas serán aparentes para aquellos expertos en la materia. Un enlazador útil es GSGGGG (SEQ ID NO: 47) o GSGSGGGG (SEQ ID NO: 48), con el dipéptido Gly-Ser formándose a partir de un sitio de restricción *Bam*HI, ayudando por tanto, a la clonación y manipulación, y siendo el tetrapéptido $(\text{Gly})_4$ un enlazador de poli-glicina típico. Otros enlazadores adecuados, particularmente para su uso como el L_n final son ASGGGS (SEQ ID NO: 49 por ejemplo, codificada por SEQ ID NO: 50) o un dipéptido Leu-Glu.

35 -A- es una secuencia de aminoácido opcional del extremo N-terminal. Típicamente será corta (por ejemplo, 40 o menos aminoácidos es decir 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias líderes para dirigir el tráfico de proteína, o secuencias de péptido cortas que facilitan la clonación o purificación (por ejemplo, marcadores de histidina, es decir, His_n en las que n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Otras secuencias de aminoácidos del extremo N-terminal apropiadas serán aparentes para aquellos expertos en la materia. Si X_1 carece en sí mismo de metionina del extremo N-terminal, A es preferentemente un oligopéptido (por ejemplo, con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 aminoácidos) que proporciona una metionina del extremo N-terminal por ejemplo, Met-Ala-Ser, o un único resto Met.

40 -B- es una secuencia opcional de aminoácidos del extremo C-terminal. Esta será típicamente corta (por ejemplo, 40 o menos aminoácidos es decir 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Los ejemplos incluyen secuencias para dirigir el tráfico de proteína, secuencias de péptido cortas que facilitan la clonación o purificación (por ejemplo, que comprenden marcadores de histidina es decir His_n en las que n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, tal como la SEQ ID NO: 51), o secuencias que aumentan la estabilidad de la proteína. Otras secuencias de aminoácido del extremo C-terminal serán aparentes para aquellos expertos en la materia.

Un polipéptido híbrido de la invención puede incluir antígenos tanto EsxA como EsxB. Estos pueden estar en cualquier orden, extremos N-terminal a C-terminal. Las SEQ ID NOs: 52 ('EsxAB'; codificada por la SEQ ID NO: 53) y 54 ('EsxBA') son ejemplos de tales híbridos, ambas teniendo enlazadores de hexapéptido ASGGGS (SEQ ID NO: 49).

50 **General**

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunobiología y farmacología, dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican por completo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, las referencias 168-175, etc.

55 Se usa anteriormente la numeración "GI". Un número GI, o "Identificador GenInfo", es una serie de dígitos asignados consecutivamente a cada registro de secuencia procesado por el NCBI cuando se agregan las secuencias a las bases de datos. El número GI no tiene ninguna semejanza con el número de acceso al registro de secuencia. Cuando se actualiza una secuencia (por ejemplo, para corrección, o para agregar más anotaciones o información) entonces recibe un nuevo número GI. Por tanto, la secuencia asociada con un número GI nunca cambia.

Las referencias al porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácido significa que, cuando se alinean, tal porcentaje de aminoácidos es el mismo en comparación con las dos secuencias. Esta alineación y el porcentaje de homología o la identidad de secuencia puede determinarse usando programas de software conocidos en la materia, por ejemplo aquellos descritos en la sección 7.7.18 de la ref. 176. Una alineación preferente se determina por el algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman usando una búsqueda de espacio afín con una penalización de abertura de espacio de 12 y una penalización de extensión de espacio de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología Smith-Waterman se desvela en la ref. 177.

Cuando la invención concierne a un "epítipo", este epítipo puede ser un epítipo de linfocito B y/o un epítipo de linfocito T. Tales epítipos pueden identificarse empíricamente (por ejemplo, usando PEPSCAN [178, 179] o procedimientos similares), o pueden predecirse (por ejemplo, usando el índice antigénico Jameson-Wolf [180], enfoques basados en matrices [181], MAPITOPE [182], TEPITOPE [183, 184], redes neurales [185], OptiMer y EpiMer [186, 187], ADEPT [188], Tsites [189], hidrofiliidad [190], índice antigénico [191] o los procedimientos desvelados en las referencias 192-196, etc.). Los epítipos son las partes de un antígeno que se reconocen mediante y se unen a los sitios de unión al antígeno de los anticuerpos o receptores de linfocitos T, y también pueden denominarse "determinantes antigénicos".

Cuando se omite un "dominio" de antígeno, esto puede implicar la omisión de un péptido de señal, de un dominio citoplasmático, de un dominio transmembrana, de un dominio extracelular, etc.

La expresión "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste" por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional por ejemplo, X + Y.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, como ejemplo, $x \pm 10\%$.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente" por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

Cuando la invención proporciona un procedimiento que implica múltiples secuenciales, la invención también puede proporcionar un procedimiento que implica menos del número total de etapas. Se pueden realizar diferentes etapas en tiempos muy diferentes por personas diferentes en lugares diferentes (por ejemplo, en países diferentes).

Se apreciará que los anillos de azúcar puedan existir en forma abierta y cerrada y que, aunque se muestran formas cerradas en las fórmulas estructurales en el presente documento, también se abarcan formas abiertas por la invención. De manera similar, se apreciará que los azúcares puedan existir en formas de piranosa y furanosa y que, aunque se muestran formas de piranosa en las fórmulas estructurales en el presente documento, también se abarcan formas de furanosa. También se abarcan formas anoméricas diferentes de azúcares.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un procedimiento para la purificación de polisacáridos capsulares de tipo 5 y de tipo 8 de *S.aureus* basado en el procedimiento de la referencia 13.

La Figura 2 muestra un cromatograma de DEAE Sepharose de polisacárido capsular y un espectro de RMN de ^1H de fracciones que contienen polisacárido capsular (fracciones 68-80) preparado según el procedimiento de la Figura 1.

La Figura 3 muestra un cromatograma S300 Sephacryl de polisacárido capsular y un espectro de RMN de ^1H de fracciones que contienen polisacárido capsular (fracciones 22-44) preparado según el procedimiento de la Figura 1.

La Figura 4 ilustra un procedimiento ejemplar de la invención para purificar polisacáridos capsulares de tipo 5 y de tipo 8 de *S.aureus*.

La Figura 5 muestra un cromatograma de DEAE Sepharose de polisacárido capsular preparado según un procedimiento de la invención.

La Figura 6 muestra un espectro de RMN de ^1H para polisacárido capsular de tipo 5 de *S.aureus* purificado.

La Figura 7 muestra la estructura química del péptidoglicano de *S.aureus* basada en las referencias 197, 198, 199 y 200. Se resalta la unidad de repetición.

Modos de llevar a cabo la invención**A. Purificación de polisacárido capsular de *S.aureus* de tipo 5 (ejemplo comparativo)**

Se purificó el polisacárido capsular de tipo 5 de *S.aureus* según el esquema ilustrado en la Figura 1, basado en el procedimiento de la referencia 13. Las condiciones y fundamento para las diversas etapas de este procedimiento se describen en la Tabla 1:

5

Tabla 1

Etapa	Condiciones	Fundamento
Crecimiento bacteriano en placas		
Centrifugación de sedimento bacteriano		Recolección de células
Reacción con Lisostafina	100 µg/ml de Lisostafina durante la noche a 37 °C	Lisis de pared celular y liberación de polisacárido capsular
Reacción con DNasa/RNasa	50 µg/ml de DNasa y RNasa a 37 °C durante 6-8 horas	Hidrólisis de ácido nucleico
Reacción con NaIO ₄	NaIO ₄ 0,05 M durante 5 horas a TA en la oscuridad	Hidrólisis de ácido teicoico
Diafiltración de 30 kDa	Lavado con NaCl 1M y H ₂ O	Eliminación de especies de bajo peso molecular
Cromatografía de intercambio aniónico(resina DEAE SepharoseFF)	Gradiente de NaCl 1M	Separación según la carga (eliminación de proteína)
Filtración en gel (Sephacryl S300)	NaPi 10 mM pH 7,2 y NaCl 10 mM	Separación según el peso molecular

Centrifugación del sedimento bacteriano y reacciones enzimáticas (Lisostafina y RNasa/DNasa)

10 Se cultivó *S.aureus* en un medio sólido para proporcionar una suspensión bacteriana de 600-800 ml. El sedimento celular húmedo, recolectado mediante centrifugación a 8000 rpm, tenía una masa de alrededor de 30-50 g. El sedimento recolectado se lavó tres veces con Tris 50 mM - MgSO₄ 2 mM a pH 7,5 y después se resuspendió a 0,25-0,5 g por ml en Tris 50 mM - MgSO₄ 2 mM a pH 7,5 y se trató con 0,1-0,13 mg/ml de lisostafina (Sigma Aldrich). La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 16 horas (ON) con agitación moderada. Se agregaron 0,05 mg/ml de DNasa/RNasa (Sigma-Aldrich) a la suspensión y se incubó durante 5-7 horas a 37 °C. La suspensión se aclaró
15 después mediante centrifugación.

Reacción con NaIO₄

El material se incubó con NaIO₄ 50 mM (Sigma-Aldrich) en la oscuridad durante 5-7 horas. El NaIO₄ se eliminó mediante la adición de glicerol en exceso durante 30 minutos con agitación en la luz.

Filtración de flujo tangencial de 30 kDa

20 La filtración de flujo tangencial se llevó a cabo tal como se indica en la Tabla 2:

Tabla 2

Tipo de membrana	Sartorius Hydrosart™ 30 kDa
Área de superficie	0,1 m ²
P _{in} /P _{ext}	0,4/0,0 bar
Caudal de permeado	80 ml/min
Volúmenes de diafiltración	10 volúmenes de NaCl 1M seguido de 10 volúmenes de agua destilada
Recuperación de producto	Volumen retenido + dos lavados con agua destilada igual al volumen muerto del sistema (con retención completamente abierta y permeado cerrado)

La filtración de flujo tangencial se realizó en un soporte Sartorius™ para casetes de 0,1 m² usando una bomba peristáltica WatsonMarlon™. Posteriormente, la membrana se lavó con NaOH 1 M y se almacenó en NaOH 0,1M a +2-8 °C.

Cromatografía de Flujo Rápido DEAE Sepharose

- 5 Se eliminó la proteína residual, el ácido nucleico y otras impurezas mediante cromatografía de intercambio aniónico llevada a cabo según la Tabla 3:

Tabla 3

Resina	Resina de flujo rápido DEAE Sepharose™ (G&E Healthcare)
Dimensión de columna	Ø = 5 cm; h = 7,5 cm; V = 150 ml
Equilibrio	Tampón NaPi 10 mM pH 7,2 c.s. para alcanzar 1,8-2,0 mS/cm de conductividad de eluato
Carga	Retenida desde 30 K UF tamponada hasta tampón NaPi 10 mM a pH 7,2
Elución	20 volúmenes de columna de tampón NaPi 10 mM pH 7,2
Depuración	20 volúmenes de columna de NaCl 1M

- 10 La cromatografía se realizó usando un sistema Akta™ (G&E Healthcare) y el polisacárido capsular se detectó midiendo la absorción UV a 215 nm. La solución de polisacárido capsular se agregó en primer lugar a tampón NaPi 100 mM pH 7,2 para obtener una concentración final de tampón NaPi de 10 mM a pH 7,2. La resina DEAE se equilibró previamente con tampón NaPi 100 mM a pH 7,2 hasta pH 7,2 y luego se equilibró con tampón NaPi 10 mM a pH 7,2 para alcanzar la conductividad indicada (conductividad de tampón NaPi 10 mM a pH 7,2). Las fracciones resultantes se analizaron mediante RMN y aquellas que contenían polisacárido capsular se agruparon (Figura 2).

15 Cromatografía S300 Sephacryl

El polisacárido se purificó adicionalmente mediante cromatografía de filtración en gel llevada a cabo según la Tabla 4:

Tabla 4

Resina	Resina S300 Sephacryl™ (G&E Healthcare)
Dimensión de columna	Ø = 2,6cm; h = 95 cm; V = 500ml
Equilibrio	Tampón NaCl 50 mM c.s. para alcanzar 6,3-6,5 mS/cm de conductividad de eluato
Carga	12-14ml
Elución	Tampón NaCl 50mM

- 20 La cromatografía se realizó en un sistema Akta™ (G&E Healthcare) y el polisacárido capsular se detectó midiendo la absorción UV a 215 nm. Las fracciones resultantes se analizaron mediante RMN y aquellas que contenían polisacárido capsular se agruparon (Figura 3).

B. Purificación de polisacáridos capsulares de *S.aureus* de tipo 5 y de tipo 8 (ejemplo)

- 25 Los polisacáridos capsulares de tipo 5 y de tipo 8 de *S.aureus* se purificaron según el esquema ilustrado en la Figura 4. Las condiciones y el fundamento para las diversas etapas de este procedimiento se describen en la Tabla 5:

Tabla 5

Etapa	Condiciones	Fundamento
Crecimiento bacteriano en placas		
Centrifugación de sedimento bacteriano		Recolección de células
Reacción con AcOH al 1 %	2 horas a 100 °C	Lisis de pared celular y liberación de polisacárido capsular

(continuación)

Etapa	Condiciones	Fundamento
Reacción con mutanolisina	180 U/ml de mutanolisina a 37 °C durante la noche	Eliminación adicional del peptidoglicano
Reacción con DNasa/RNasa	50 µg/ml de DNasa y RNasa a 37 °C durante 6-8 horas	Hidrólisis de ácido nucleico
Diafiltración de 30 kDa	Lavado con NaCl 1 M y H ₂ O	Eliminación de especies de bajo peso molecular
Cromatografía de intercambio aniónico (resina DEAE SepharoseFF)	Gradiente de NaCl 1 M	Separación según la carga (eliminación de proteína)

Centrifugación de sedimento bacteriano y reacciones con ácido y enzimáticas (ácido acético, RNasa/DNasa y mutanolisina)

- 5 Se cultivó *S.aureus* en un medio sólido para proporcionar una suspensión bacteriana de 600-800 ml. El sedimento celular húmedo, recolectado mediante centrifugación a 8000 rpm, tenía una masa de aproximadamente 30-50 g. El sedimento recolectado se lavó tres veces con Tris 50 mM - MgSO₄ 2 mM a pH 7,5 y después se resuspendió a 0,5-0,6 g por ml en agua destilada y se agitó vigorosamente mientras se elevó la temperatura hasta 100 °C. Después se agregó ácido acético hasta una concentración final del 1 % y la mezcla se mantuvo a 100 °C durante 2 horas. La mezcla se neutralizó con NaOH 1 M y se centrifugó a 8000 rpm.
- 10 Se decantó el sobrenadante del sedimento y se combinó con 0,05 mg/ml de DNasa/RNasa (Sigma-Aldrich). La mezcla se incubó después durante 5-7 horas a 37 °C y posteriormente se aclaró mediante centrifugación.

Se agregaron entonces 180 U/ml de mutanolisina (Sigma-Aldrich) a la suspensión y la mezcla se incubó durante la noche (durante 16 horas) a 37 °C con agitación moderada. Después, la suspensión se aclaró mediante centrifugación.

Filtración de flujo tangencial de 30 kDa

- 15 La filtración de flujo tangencial se llevó a cabo tal como se indica en la Tabla 6:

Tabla 6

Tipo de membrana	Sartorius Hydrosart™ de 30 kDa
Área de superficie	0,2 m ²
P _{in} /P _{ext}	0,7/0,0 bar
Caudal de permeado	11 ml/min
Volúmenes de diafiltración	10 volúmenes de NaCl 1 M seguido de 10 volúmenes de tampón NaPi 10 mM a pH 7,2
Recuperación del producto	Volumen retenido + dos lavados con agua destilada igual al volumen muerto del sistema (con retención completamente abierta y permeado cerrado)

La filtración de flujo tangencial se realizó en un soporte Sartorius™ para casetes de 0,2 m² usando una bomba peristáltica WatsonMarlon™. Posteriormente, la membrana se lavó con NaOH 1 M y se almacenó en NaOH 0,1 M a +2-8 °C.

- 20 Cromatografía de Flujo Rápido en DEAE Sepharose

Se eliminaron la proteína residual, el ácido nucleico y otras impurezas mediante cromatografía de intercambio aniónico llevada a cabo según la Tabla 7:

Tabla 7

Resina	Resina de flujo rápido DEAE Sepharose™ (G&E Healthcare)
Dimensión de columna	Ø = 5 cm; h = 7,5cm; V = 150 ml
Equilibrio	Tampón NaPi 10 mM a pH 7,2 c.s. para alcanzar 1,8-2,0 mS/cm de conductividad de eluido
Carga	Retención desde 30K UF
Elución	20 volúmenes de columna de tampón NaPi 10 mM a pH 7,2
Depuración	20 volúmenes de columna de NaCl 1M

La cromatografía se realizó usando un sistema Akta™ (G&E Healthcare) y el polisacárido capsular se detectó midiendo la absorción UV a 215 nm. La solución de polisacárido capsular se agregó primero a tampón NaPi 100 mM a pH 7,2 para obtener una concentración final de tampón NaPi 10 mM a pH 7,2. La resina DEAE se equilibró previamente con tampón NaPi 100 mM a pH 7,2 hasta pH 7,2 y después se equilibró con tampón NaPi 10 mM a pH 7,2 para alcanzar la conductividad indicada (conductividad de tampón NaPi 10 mM a pH 7,2). Las fracciones resultantes se analizaron mediante RMN y aquellas que contienen polisacárido capsular se agruparon (Figura 5).

Filtración de flujo tangencial de 30 kDa

La filtración de flujo tangencial se llevó a cabo para eliminar el NaCl que queda de la cromatografía de intercambio aniónico y para concentrar los polisacáridos purificados. La filtración se llevó a cabo tal como se indica en la Tabla 8:

Tabla 8

Tipo de membrana	Sartorius Hydrosart™ de 30 kDa
Área de superficie	0,2 m ²
P _{in} /P _{ext}	0,7/0,0 bar
Caudal de permeado	11 ml/min
Volúmenes de diafiltración	10 volúmenes de agua destilada
Recuperación de producto	Volumen retenido + dos lavados con agua destilada igual al volumen muerto del sistema (con retención completamente abierta y permeado cerrado)

La filtración de flujo tangencial se realizó en un soporte Sartorius™ para casetes de 0,2 m² usando una bomba peristáltica WatsonMarlon™. Posteriormente, la membrana se lavó con NaOH 1 M y se almacenó en NaOH 0,1 M a +2-8 °C. El polisacárido purificado se analizó mediante RMN (por ejemplo, Figura 6 para el polisacárido capsular de tipo 5).

C. Determinación de contaminación de peptidoglicanos en polisacárido purificado

El contenido de peptidoglicano (Figura 7) del polisacárido de tipo 5 purificado obtenido según los procedimientos en las secciones A y B anteriores se determinó mediante análisis de aminoácidos usando HPAEC-PAD según el sistema Dionex AAA Direct™ (AminoPac™ PA10 AAA-Direct™, Dionex) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregaron 20 µl de norleucina 100 µM a 200 µl de polisacárido a 250 µg/ml en agua en un tubo de vidrio tratado a 400 °C y se secó usando un sistema Speedvac. La norleucina sirve como un patrón interno. Se hidrolizaron las muestras *in vacuo* usando el vapor del ácido clorhídrico/fenol en ebullición con el fin de producir aminoácidos libres a partir de la proteína residual y contaminación de peptidoglicanos. La separación de aminoácidos libres se realizó en una columna AminoPac™ PA10 (2x250 mm) equipada con una columna de guardia AminoPac™ PA10 (2x50 mm) usando una condición de gradiente para aminoácidos e hidratos de carbono de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Estas condiciones de gradiente se resumen en la Tabla 9:

Tabla 9

Tiempo (min)	% de E1	% de E2	% de E3	Curva	Comentarios
Inicio	84	16	0		El automuestreador rellena el bucle de muestra
0,0	84	16	0		Válvula de la carga a inyectar
2,0	84	16	0		Comienza el gradiente de hidróxido
12,1	68	32	0	8	
16,0	68	32	0		Comienza el gradiente de acetato
24,0	36	24	40	8	
40,0	36	24	40		
40,1	20	80	0	5	Lavado de la columna con hidróxido
42,1	20	80	0		
42,2	84	16	0	5	Equilibrado para iniciar condiciones
65,0	84	16	0		

Eluyente E1: Agua desionizada; Eluyente E2: hidróxido de sodio 0,250 M; Eluyente E3: Acetato de sodio 1,0 M y Caudal=0,25 ml/min

La detección se realizó usando un potencial de forma de onda AAA-Direct (Tabla 10).

Tabla 10

Tiempo (seg)	Potencial (V) frente a Ag/AgCl	Potencial (V) frente. pH	Integración
0,000	-0,20	+0,13	
0,040	-0,20	+0,13	
0,050	0,00	+0,33	
0,210	0,00	+0,33	Comienzo
0,220	+0,22	+0,55	
0,460	+0,22	+0,55	
0,470	0,00	+0,33	
0,560	0,00	+0,33	Final
0,570	-0,20	-1,67	
0,580	-0,20	-1,67	
0,590	+0,60	+0,93	
0,600	-0,20	+0,13	

Se realizó la cuantificación usando una solución patrón de 17 aminoácidos no hidrolizada (Fluka P/N 09428) en el intervalo de 2,5-50 μ M. Se analizaron las muestras patrón con y sin norleucina, en la misma concentración de muestra. Se usó la proporción del área pico de norleucina en la muestra dividida entre el área pico de norleucina promedio en los patrones como un factor de corrección para la posible pérdida de aminoácidos en la etapa de hidrólisis. Se usó una muestra de BSA como muestra de control.

Estimación del contenido de peptidoglicano

Se estimó el contenido de peptidoglicano usando dos procedimientos diferentes. El primer procedimiento (procedimiento 1) estaba basado en el procedimiento usado en la referencia 17, que implica una suma del contenido de lisina, alanina, glicina y glutamato. En el segundo procedimiento (procedimiento 2), se calculó un factor de conversión para cada aminoácido según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{(masa molecular de aminoácido)} \times \text{(número de restos en la estructura de peptidoglicano)}}{\text{(masa molecular de la unidad de repetición de peptidoglicano)}}$$

La masa molecular de la unidad de repetición de peptidoglicano es 1233,27 Da (Figura 7). El contenido de peptidoglicano se calculó después como la concentración promedio de peptidoglicano obtenida al calcular la proporción de la concentración de aminoácido y el factor de conversión.

El contenido de péptidoglicano de polisacárido capsular de tipo 5 purificado tras la cromatografía de intercambio aniónico se da en la Tabla 11:

Tabla 11

Procedimiento de medición	Detalles del cálculo	% de péptidoglicano	
		Medición 1	Medición 2
1	Calculado según la referencia 17 como la suma de la concentración Lys-Ala-Gly-Glx	2,04	0,74
1	Calculado según la referencia 17 como la suma de todos los aminoácidos detectables excepto para Lys-Ala-Gly-Glx	0,48	0,85
2	Calculado usando la concentración Ala y Gly dividida entre el factor de conversión de PG (Ala = 0,2167, Gly = 0,3043)	0,88	0,81

El procedimiento de la invención proporciona un contenido muy bajo de peptidoglicano en el polisacárido purificado.

D. Conjugación e inmunogenicidad de polisacáridos purificados

Los polisacáridos de tipo 5 purificados obtenidos de los procedimientos en las secciones A y B anteriores se conjugaron con CRM197 según el procedimiento de la referencia 29. El sacárido total en el conjugado se determinó mediante análisis HPAEC-PAD y el contenido de proteína mediante ensayo MicroBCA (Tabla 12).

TABLA 12

Procedimiento de purificación	Lote	Proteína (µg/ml)	Sacárido (µg/ml)	Sacárido/proteína (p/p)
A	1	51,52	1,72	0,03
A	2	161,80	17,10	0,11
A	3	34,42	4,22	0,12
B	4	444,0	139,0	0,31
B	5	40,56	12,70	0,31

Los conjugados preparados usando los polisacáridos purificados mediante el procedimiento de la invención (lotes 4 y 5) tuvieron mayores proporciones de polisacárido:proteína.

- 5 La inmunogenicidad del lote 5 se probó en un modelo letal de ratón de infección por *S.aureus*. Brevemente, se inmunizaron ratones CD1 mediante inyección intraperitoneal con una dosis de 2 µg de antígeno en un volumen de inyección de 200 µl. Se llevaron a cabo las inmunizaciones en grupos de doce ratones según el siguiente esquema, antes de la exposición mediante inyección intraperitoneal de una suspensión bacteriana de 5x10⁸ UFC de *S.aureus* de tipo 5. Se centrifugaron los cultivos de *S.aureus*, se lavaron dos veces y se diluyeron en PBS antes de la exposición. Se necesitaron diluciones adicionales para el inóculo deseado, que se verificó de manera experimental mediante la por colocación en placas de agar y la formación de colonias. Los animales se controlaron durante 14 días y se registró la enfermedad letal.

Grupo 1 – PBS más alum

Grupo 2 – conjugado de polisacárido capsular de tipo 5-CRM (Lote 5) más alum

- 15 Grupo 4 –conjugado de polisacárido capsular de tipo 5-CRM (Lote 5) más proteínas EsxAB, Sta006 y Sta011 y alum

Grupo 5 –conjugado de polisacárido capsular de tipo 5-CRM (Lote 5) más proteínas HlaH35L, Sta006 y Sta011 y alum

Los datos de supervivencia se representan en la Tabla 13:

20

TABLA 13

Grupo	Tiempo (días)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	100	25	17	17	17	17	17	17	17	17	8	0	0	0
2	100	50	50	50	50	50	50	50	50	42	42	42	42	42
4	100	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67	67
5	100	100	100	100	100	100	83	83	75	75	75	75	75	75

Los conjugados preparados usando polisacáridos purificados mediante el procedimiento de la invención dieron un nivel alto de supervivencia. Se mejoró la supervivencia mediante la adición de antígenos de proteína de *S.aureus*.

Referencias

- 25 [1] Fattom y col. (1990) *Infect Immun*. 58(7):2367-74.
 [2] Fattom y col. (1992) *Infect Immun*. 60(2):584-9.
 [3] Fattom y col. (1993) *Infect Immun*. 61(3):1023-32.
 [4] Fattom y col. (1996) *Infect Immun*. 64(5):1659-65.
 [5] Welch y col. (1996) *J Am Soc Nephrol*. 7(2):247-53.
 30 [6] Fattom y col. (1998) *Infect Immun*. 66(10):4588-92.
 [7] Fattom y col. (1993) *Vaccine* 17(2):126-33.
 [8] Fattom y col. (2002) *N Engl J Med*. 346(7):491-6.
 [9] Robbins y col. (2005) *Ann N Y Acad Sci*. 754:68-82.
 [10] Gilbert y col. (1994) *J. Microb. Meth*. 20:39-46.
 35 [11] Gilbert y col. (1994) *Vaccine*. 12(4):369-74.
 [12] Tollersrud y col. (2001) *Vaccine*. 19(28-29):3896-903.
 [13] Lee y col. (1993) *Infect Immun* 61:1853-8.
 [14] WO2004/080490.

- [15] WO2006/032475.
 [16] WO2006/032500.
 [17] WO2006/065553.
 [18] WO2006/114500.
- 5 [19] Moreau y col. (1990) *Carbohydrate Res.* 339(5):285-91
 [20] Fournier y col. (1984) *Infect. Immun.* 45(1):87-93.
 [21] Jones (2005) *Carbohydrate Res.* 340(6):1097-106.
 [22] Lemercinier and Jones (1996) *Carbohydrate Res.* 296:83-96.
 [23] Jones and Lemercinier (2002) *J Pharm Biomed Anal.* 30(4):1233-47.
- 10 [24] WO05/033148
 [25] WO 00/56357
 [26] Hestrin (1949) *J. Biol. Chem.* 180:249-261.
 [27] Konadu y col. (1994) *Infect. Immun.* 62:5048-5054.
 [28] www.polymer.de
- 15 [29] Solicitud de Patente de E.U.A. 61/247,518, 'CONJUGATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TYPE 5 AND TYPE 8 CAPSULAR POLYSACCHARIDES' (NOVARTIS AG). No. de referencia asignado 53594-US-PSP y Solicitud PCT No. PCT/IB2010/002565 (NOVARTIS AG).
 [30] WO2007/113222
 [31] Patente de E.U.A. 6,045,805
- 20 [32] Patentes de E.U.A. 6,027,733 y 6,274,144.
 [33] www.polymer.de
 [34] Wessels y col. (1989) *Infect Immun* 57:1089-94.
 [35] Ramsay y col. (2001) *Lancet* 357(9251):195-196.
 [36] Lindberg (1999) *Vaccine* 17 Suppl 2:S28-36.
- 25 [37] Buttery & Moxon (2000) *J R Coll Physicians Lond* 34:163-68.
 [38] Ahmad & Chapnick (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:113-33, vii.
 [39] Goldblatt (1998) *J. Med. Microbiol.* 47:563-7.
 [40] Patente Europea 0477508.
 [41] Patente de E.U.A. 5,306,492.
- 30 [42] WO98/42721.
 [43] Dick y col. in *Conjugate Vaccines* (eds. Cruse y col.) Karger, Basel, 1989, 10:48-114.
 [44] Hermanson *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996) ISBN: 0123423368.
 [45] Reynaud-Rondier y col. (1991) *FEMS Microbiology Immunology* 76:193-200.
 [46] WO03/061558.
- 35 [47] *Research Disclosure*, 453077 (Enero 2002)
 [48] Herbelin y col. (1997) *J Dairy Sci.* 80(9):2025-34.
 [49] EP-A-0372501.
 [50] EP-A-0378881.
 [51] EP-A-0427347.
- 40 [52] WO93/17712
 [53] WO94/03208.
 [54] WO98/58668.
 [55] EP-A-0471177.
 [56] WO91/01146
- 45 [57] Falugi y col. (2001) *Eur J Immunol* 31:3816-3824.
 [58] Baraldo y col. (2004) *Infect Immun* 72(8):4884-7.
 [59] EP-A-0594610.
 [60] Ruan y col. (1990) *J Immunol* 145:3379-3384.
 [61] WO00/56360.
- 50 [62] WO02/091998.
 [63] Kuo y col. (1995) *Infect Immun* 63:2706-13.
 [64] Michon y col. (1998) *Vaccine.* 16:1732-41.
 [65] WO01/72337
 [66] WO00/61761.
- 55 [67] WO2004/041157.
 [68] WO02/34771.
 [69] WO99/42130.
 [70] WO2004/011027.
 [71] WO96/40242.
- 60 [72] Lei y col. (2000) *Dev Biol (Basel)* 103:259-264.
 [73] WO00/38711; US patent 6,146,902.
 [74] WO99/24578.
 [75] WO99/36544.
 [76] WO99/57280.
- 65 [77] WO00/22430.
 [78] Tettelin y col. (2000) *Science* 287:1809-1815.

- [79] WO96/29412.
 [80] Pizza y col. (2000) *Science* 287:1816-1820.
 [81] WO01/52885.
 [82] Bjune y col. (1991) *Lancet* 338(8775):1093-1096.
 5 [83] Fukasawa y col. (1999) *Vaccine* 17:2951-2958.
 [84] Rosenqvist y col. (1998) *Dev. Biol. Stand.* 92:323-333.
 [85] Costantino y col. (1992) *Vaccine* 10:691-698.
 [86] WO03/007985.
 [87] Watson (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:331-332.
 10 [88] Rubin (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:269-285, v.
 [89] Jedrzejewski (2001) *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187-207.
 [90] Bell (2000) *Pediatr Infect Dis J* 19:1187-1188.
 [91] Iwarson (1995) *APMIS* 103:321-326.
 [92] Gerlich y col. (1990) *Vaccine* 8 Suppl:S63-68 & 79-80.
 15 [93] Hsu y col. (1999) *Clin Liver Dis* 3:901-915.
 [94] Gustafsson y col. (1996) *N. Engl. J. Med.* 334:349-355.
 [95] Rappuoli y col. (1991) *TIBTECH* 9:232-238.
 [96] *Vaccines* (2004) eds. Plotkin & Orenstein. ISBN 0-7216-9688-0.
 [97] WO02/02606.
 20 [98] Kalman y col. (1999) *Nature Genetics* 21:385-389.
 [99] Read y col. (2000) *Nucleic Acids Res* 28:1397-406.
 [100] Shirai y col. (2000) *J. Infect. Dis.* 181(Suppl 3):S524-S527.
 [101] WO99/27105.
 [102] WO00/27994.
 25 [103] WO00/37494.
 [104] WO99/28475.
 [105] Ross y col. (2001) *Vaccine* 19:4135-4142.
 [106] Sutter y col. (2000) *Pediatr Clin North Am* 47:287-308.
 [107] Zimmerman & Spann (1999) *Am Fam Physician* 59:113-118, 125-126.
 30 [108] Dreesen (1997) *Vaccine* 15 Suppl:S2-6.
 [109] *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998 Jan 16;47(1):12, 19.
 [110] McMichael (2000) *Vaccine* 19 Suppl 1:S101-107.
 [111] WO02/34771.
 [112] Dale (1999) *Infect Dis Clin North Am* 13:227-43, viii.
 35 [113] Ferretti y col. (2001) *PNAS USA* 98: 4658-4663.
 [114] WO03/093306.
 [115] WO2004/018646.
 [116] WO2004/041157.
 [117] Ichiman and Yoshida (1981) *J. Appl. Bacteriol.* 51:229.
 40 [118] US4197290
 [119] Ichiman y col. (1991) *J. Appl. Bacteriol.* 71:176.
 [120] Robinson & Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283.
 [121] Donnelly y col. (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648.
 [122] Scott-Taylor & Dalgleish (2000) *Expert Opin Investig Drugs* 9:471-480.
 45 [123] Apostolopoulos & Plebanski (2000) *Curr Opin Mol Ther* 2:441-447.
 [124] Ilan (1999) *Curr Opin Mol Ther* 1:116-120.
 [125] Dubensky y col. (2000) *Mol Med* 6:723-732.
 [126] Robinson & Pertmer (2000) *Adv Virus Res* 55:1-74.
 [127] Donnelly y col. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162(4 Pt 2):S190-193.
 50 [128] Davis (1999) *Mt. Sinai J. Med.* 66:84-90.
 [129] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20a edición, ISBN: 0683306472.
 [130] Joyce y col. (2003) *Carbohydrate Research* 338:903.
 [131] Maira-Litran y col. (2002) *Infect. Immun.* 70:4433.
 [132] WO2004/043407.
 55 [133] WO2007/113224.
 [134] WO2004/043405
 [135] WO98/10788.
 [136] WO2007/053176.
 [137] WO2007/113222.
 60 [138] WO2005/009379.
 [139] WO2009/029132.
 [140] WO2008/079315.
 [141] WO2005/086663.
 [142] WO2005/115113.
 65 [143] WO2006/033918.
 [144] WO2006/078680.

- [145] Kuroda y col. (2001) *Lancet* 357(9264):1225-1240; ver también páginas 1218-1219.
- [146] Sjodahl (1977) *J. Biochem.* 73:343-351.
- [147] Uhlen y col. (1984) *J. Biol. Chem.* 259:1695-1702 & 13628 (Corr.).
- [148] Schneewind y col. (1992) *Cell* 70:267-281.
- 5 [149] DeDent y col. (2008) *EMBO J.* 27:2656-2668.
- [150] Sjoquist y col. (1972) *Eur. J. Biochem.* 30:190-194.
- [151] DeDent y col. (2007) *J. Bacteriol.* 189:4473-4484.
- [152] Deisenhofer y col., (1978) *Hoppe-Seyh Zeitsch. Physiol. Chem.* 359:975-985.
- [153] Deisenhofer (1981) *Biochemistry* 20:2361-2370.
- 10 [154] Graille y col. (2000) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97:5399-5404.
- [155] O'Seaghda y col. (2006) *FEBS J.* 273:4831-41.
- [156] Gomez y col. (2006) *J. Biol. Chem.* 281:20190-20196.
- [157] WO2007/071692.
- [158] Sebulsky & Heinrichs (2001) *J Bacteriol* 183:4994-5000.
- 15 [159] Sebulsky y col. (2003) *J Biol Chem* 278:49890-900.
- [160] WO2005/009378.
- [161] Rable & Wardenburg (2009) *Infect Immun* 77:2712-8.
- [162] WO2007/145689.
- [163] WO2009/029831.
- 20 [164] WO2005/079315.
- [165] WO2008/152447.
- [166] Kuklin y col. (2006) *Infect Immun.* 74(4):2215-23.
- [167] WO2005/009379.
- [168] Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*. 20a edición, ISBN: 0683306472.
- 25 [169] *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
- [170] *Handbook of Experimental Immunology*, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
- [171] Sambrook y col. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3a edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 30 [172] *Handbook of Surface and Colloidal Chemistry* (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
- [173] Ausubel y col. (eds) (2002) *Short protocols in molecular biology*, 5a edición (Current Protocols).
- [174] *Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course*, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press)
- [175] *PCR (Introduction to Biotechniques Series)*, 2a ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag)
- [176] *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel y col., eds., 1987) complemento 30
- 35 [177] Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [178] Geysen y col. (1984) *PNAS USA* 81:3998-4002.
- [179] Carter (1994) *Methods Mol Biol* 36:207-23.
- [180] Jameson, BA y col. 1988, *CABIOS* 4(1):181-186.
- [181] Raddrizzani & Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1(2):179-89.
- 40 [182] Bublil y col. (2007) *Proteins* 68(1):294-304.
- [183] De Lalla y col. (1999) *J. Immunol.* 163:1725-29.
- [184] Kwok y col. (2001) *Trends Immunol* 22:583-88.
- [185] Brusica y col. (1998) *Bioinformatics* 14(2):121-30
- [186] Meister y col. (1995) *Vaccine* 13(6):581-91.
- 45 [187] Roberts y col. (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* 12(7):593-610.
- [188] Maksyutov & Zagrebelaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9(3):291-7.
- [189] Feller & de la Cruz (1991) *Nature* 349(6311):720-1.
- [190] Hopp (1993) *Peptide Research* 6:183-190.
- [191] Welling y col. (1985) *FEBS Lett.* 188:215-218.
- 50 [192] Davenport y col. (1995) *Immunogenetics* 42:392-297.
- [193] Tsurui & Takahashi (2007) *J Pharmacol Sci.* 105(4):299-316.
- [194] Tong y col. (2007) *Brief Bioinform.* 8(2):96-108.
- [195] Schirle y col. (2001) *J Immunol Methods.* 257(1-2):1-16.
- [196] Chen y col. (2007) *Amino Acids* 33(3):423-8.
- 55 [197] Kim y col. (2008) *Biochemistry* 47(12):3822-3831.
- [198] Patti y col. (2008) *Biochemistry* 47(32):8378-8385.
- [199] Kim and Schaefer (2008) *Biochemistry* 47(38):10155-10161.
- [200] Biswas (2006) PhD Thesis: *Characterization of Staphylococcus aureus peptidoglycan hydrolases and isolation of defined peptidoglycan structures* der Eberhard Karls Universität Tübingen

60 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS AG

<120> PURIFICACIÓN DE SACÁRIDOS CAPSULARES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS DE TIPO 5 Y TIPO 8

ES 2 626 416 T3

<130> P055840WO

<140> PCT/IB2010/

<141> 01-11-2010

5

<150> US-61/256,905

<151> 30-10-2009

<160> 54

10

<170> SeqWin2010, versión 1.0

<210> 1

<211> 927

15

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 1

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

20

ES 2 626 416 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala

ES 2 626 416 T3

515					520					525					
Phe	Asn	Asn	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Gly	Ile	Asp	Lys	Pro	Val	Val
	530					535					540				
Pro	Glu	Gln	Pro	Asp	Glu	Pro	Gly	Glu	Ile	Glu	Pro	Ile	Pro	Glu	Asp
545					550					555					560
Ser	Asp	Ser	Asp	Pro	Gly	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Asp	Ser	Asn	Ser	Asp
				565					570					575	
Ser	Gly	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Asp	Ser	Thr	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Asp
			580					585					590		
Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp
		595					600					605			
Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
	610					615					620				
Asn	Asp	Ser	Asp												
625					630					635					640
Ser	Asp														
				645					650					655	
Ser	Asp														
			660					665					670		
Ser	Asp														
		675					680					685			
Ser	Asp														
	690					695					700				
Ser	Asp														
705				710					715					720	
Ser	Asp														
				725					730					735	
Ser	Asp														
			740					745					750		
Ser	Asp	Ser	Ala												
		755					760					765			
Ser	Asp														
	770					775					780				
Ser	Asp														
785				790					795					800	
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Glu	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp
				805					810					815	
Ser	Asp	Ser	Ala												
			820					825					830		
Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	Ser	Asp
		835					840						845		

ES 2 626 416 T3

Ser Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asp Ser Glu Ser Val Ser Asn Asn Asn
 850 855 860
 Val Val Pro Pro Asn Ser Pro Lys Asn Gly Thr Asn Ala Ser Asn Lys
 865 870 875 880
 Asn Glu Ala Lys Asp Ser Lys Glu Pro Leu Pro Asp Thr Gly Ser Glu
 885 890 895
 Asp Glu Ala Asn Thr Ser Leu Ile Trp Gly Leu Leu Ala Ser Ile Gly
 900 905 910
 Ser Leu Leu Leu Phe Arg Arg Lys Lys Glu Asn Lys Asp Lys Lys
 915 920 925

<210> 2
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

5

<400> 2

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

10

ES 2 626 416 T3

Thr Val Tyr Pro His Gln Ala Gly Tyr Val Lys Leu Asn Tyr Gly Phe
 210 215 220
 Ser Val Pro Asn Ser Ala Val Lys Gly Asp Thr Phe Lys Ile Thr Val
 225 230 235 240
 Pro Lys Glu Leu Asn Leu Asn Gly Val Thr Ser Thr Ala Lys Val Pro
 245 250 255
 Pro Ile Met Ala Gly Asp Gln Val Leu Ala Asn Gly Val Ile Asp Ser
 260 265 270
 Asp Gly Asn Val Ile Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asn Thr Lys Asp
 275 280 285
 Asp Val Lys Ala Thr Leu Thr Met Pro Ala Tyr Ile Asp Pro Glu Asn
 290 295 300
 Val Lys Lys Thr Gly Asn Val Thr Leu Ala Thr Gly Ile Gly Ser Thr
 305 310 315 320
 Thr Ala Asn Lys Thr Val Leu Val Asp Tyr Glu Lys Tyr Gly Lys Phe
 325 330 335
 Tyr Asn Leu Ser Ile Lys Gly Thr Ile Asp Gln Ile Asp Lys Thr Asn
 340 345 350
 Asn Thr Tyr Arg Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro Ser Gly Asp Asn Val
 355 360 365
 Ile Ala Pro Val Leu Thr Gly Asn Leu Lys Pro Asn Thr Asp Ser Asn
 370 375 380
 Ala Leu Ile Asp Gln Gln Asn Thr Ser Ile Lys Val Tyr Lys Val Asp
 385 390 395 400
 Asn Ala Ala Asp Leu Ser Glu Ser Tyr Phe Val Asn Pro Glu Asn Phe
 405 410 415
 Glu Asp Val Thr Asn Ser Val Asn Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Gln
 420 425 430
 Tyr Lys Val Glu Phe Asn Thr Pro Asp Asp Gln Ile Thr Thr Pro Tyr
 435 440 445
 Ile Val Val Val Asn Gly His Ile Asp Pro Asn Ser Lys Gly Asp Leu
 450 455 460
 Ala Leu Arg Ser Thr Leu Tyr Gly Tyr Asn Ser Asn Ile Ile Trp Arg
 465 470 475 480
 Ser Met Ser Trp Asp Asn Glu Val Ala Phe Asn Asn Gly Ser Gly Ser
 485 490 495
 Gly Asp Gly Ile Asp Lys Pro Val Val Pro Glu Gln Pro Asp Glu Pro
 500 505 510
 Gly Glu Ile Glu Pro Ile Pro Glu
 515 520

<210> 3
<211> 877
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

5

<400> 3

ES 2 626 416 T3

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

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

Ile Leu Phe Gly Ile Gly Asn His Gln Ala Gln Ala Ser Glu Gln Ser
35 40 45

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

Lys Asn Asn Met Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr Thr Ala Asn Asp
65 70 75 80

Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn Val Asp Ser Thr
85 90 95

Thr Lys Pro Met Ser Thr Gln Thr Ser Asn Thr Thr Thr Thr Glu Pro
100 105 110

Ala Ser Thr Asn Glu Thr Pro Gln Pro Thr Ala Ile Lys Asn Gln Ala
115 120 125

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

Gln Val Asp Asn Lys Thr Thr Asn Asp Ala Asn Ser Ile Ala Thr Asn
145 150 155 160

Ser Glu Leu Lys Asn Ser Gln Thr Leu Asp Leu Pro Gln Ser Ser Pro
165 170 175

Gln Thr Ile Ser Asn Ala Gln Gly Thr Ser Lys Pro Ser Val Arg Thr
180 185 190

Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val Val Asn Ala Ala
195 200 205

Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr Ala Ser Asn Phe
210 215 220

Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser Gly Asn Thr Phe
225 230 235 240

Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
245 250 255

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

Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp Ile Lys Ser Thr
275 280 285

Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Thr Lys Thr
290 295 300

ES 2 626 416 T3

Tyr Thr Phe Val Phe Thr Asp Tyr Val Asn Asn Lys Glu Asn Ile Asn
 305 310 315 320
 Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala Lys Ala Pro Lys
 325 330 335
 Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp Glu Met Phe Asn
 340 345 350
 Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys
 355 360 365
 Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala
 370 375 380
 Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln
 385 390 395 400
 Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys
 405 410 415
 Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg
 420 425 430
 Ile Phe Glu Val Asn Asp Thr Ser Lys Leu Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala
 435 440 445
 Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asn
 450 455 460
 Arg Ile Tyr Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser Ile Lys Phe Gly Asp
 465 470 475 480
 Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr
 485 490 495
 Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn Val Asp Pro Val
 500 505 510
 Thr Asn Arg Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val
 515 520 525
 Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn Pro Lys
 530 535 540
 Asp Pro Thr Pro Gly Pro Pro Val Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Pro
 545 550 555 560
 Glu Pro Glu Pro Thr Pro Asp Pro Glu Pro Ser Pro Asp Pro Glu Pro
 565 570 575
 Glu Pro Ser Pro Asp Pro Asp Pro Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 580 585 590
 Gly Ser Asp Ser Asp Ser Gly Ser Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser
 595 600 605
 Asp Ser Glu Ser
 610 615 620

ES 2 626 416 T3

Asp Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Glu Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 625 630 635 640
 Asp Ser
 645 650 655
 Asp Ser
 660 665 670
 Asp Ser
 675 680 685
 Asp Ser
 690 695 700
 Asp Ser
 705 710 715 720
 Asp Ser
 725 730 735
 Asp Ser
 740 745 750
 Asp Ser
 755 760 765
 Asp Ser
 770 775 780
 Asp Ser
 785 790 795 800
 Asp Ser Asp Ser Arg Val Thr Pro Pro Asn Asn Glu Gln Lys Ala Pro
 805 810 815
 Ser Asn Pro Lys Gly Glu Val Asn His Ser Asn Lys Val Ser Lys Gln
 820 825 830
 His Lys Thr Asp Ala Leu Pro Glu Thr Gly Asp Lys Ser Glu Asn Thr
 835 840 845
 Asn Ala Thr Leu Phe Gly Ala Met Met Ala Leu Leu Gly Ser Leu Leu
 850 855 860
 Leu Phe Arg Lys Arg Lys Gln Asp His Lys Glu Lys Ala
 865 870 875

<210> 4
 <211> 508
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

5

<400> 4

ES 2 626 416 T3

Ser Glu Gln Ser Asn Asp Thr Thr Gln Ser Ser Lys Asn Asn Ala Ser
1 5 10 15
Ala Asp Ser Glu Lys Asn Asn Met Ile Glu Thr Pro Gln Leu Asn Thr
 20 25 30
Thr Ala Asn Asp Thr Ser Asp Ile Ser Ala Asn Thr Asn Ser Ala Asn

ES 2 626 416 T3

Tyr Gln Asp Lys Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Ser Ala Thr Asp
 370 375 380
 Thr Lys Leu Arg Ile Phe Glu Val Asn Asp Thr Ser Lys Leu Ser Asp
 385 390 395 400
 Ser Tyr Tyr Ala Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu Lys Glu Val Thr Asp
 405 410 415
 Gln Phe Lys Asn Arg Ile Tyr Tyr Glu His Pro Asn Val Ala Ser Ile
 420 425 430
 Lys Phe Gly Asp Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val Leu Val Glu Gly His
 435 440 445
 Tyr Asp Asn Thr Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln Val Ile Gln Glu Asn
 450 455 460
 Val Asp Pro Val Thr Asn Arg Asp Tyr Ser Ile Phe Gly Trp Asn Asn
 465 470 475 480
 Glu Asn Val Val Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala Asp Gly Asp Ser Ala
 485 490 495
 Val Asn Pro Lys Asp Pro Thr Pro Gly Pro Pro Val
 500 505

<210> 5
 5 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 5

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

ES 2 626 416 T3

Ser Val Arg Thr Arg Ala Val Arg Ser Leu Ala Val Ala Glu Pro Val
 145 150 155 160

Val Asn Ala Ala Asp Ala Lys Gly Thr Asn Val Asn Asp Lys Val Thr
 165 170 175

Ala Ser Asn Phe Lys Leu Glu Lys Thr Thr Phe Asp Pro Asn Gln Ser
 180 185 190

Gly Asn Thr Phe Met Ala Ala Asn Phe Thr Val Thr Asp Lys Val Lys
 195 200 205

Ser Gly Asp Tyr Phe Thr Ala Lys Leu Pro Asp Ser Leu Thr Gly Asn
 210 215 220

Gly Asp Val Asp Tyr Ser Asn Ser Asn Asn Thr Met Pro Ile Ala Asp
 225 230 235 240

Ile Lys Ser Thr Asn Gly Asp Val Val Ala Lys Ala Thr Tyr Asp Ile
 245 250 255

Leu Thr Lys Thr Tyr Thr Phe Val Phe Thr Asp Tyr Val Asn Asn Lys
 260 265 270

Glu Asn Ile Asn Gly Gln Phe Ser Leu Pro Leu Phe Thr Asp Arg Ala
 275 280 285

Lys Ala Pro Lys Ser Gly Thr Tyr Asp Ala Asn Ile Asn Ile Ala Asp
 290 295 300

Glu Met Phe Asn Asn Lys Ile Thr Tyr Asn Tyr Ser
 305 310 315

5 <210> 6
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 6

ES 2 626 416 T3

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

ES 2 626 416 T3

Ser Ser Pro Ile Ala Gly Ile Asp Lys Pro Asn Gly Ala Asn Ile Ser
 1 5 10 15

Ser Gln Ile Ile Gly Val Asp Thr Ala Ser Gly Gln Asn Thr Tyr Lys
 20 25 30

Gln Thr Val Phe Val Asn Pro Lys Gln Arg Val Leu Gly Asn Thr Trp
 35 40 45

Val Tyr Ile Lys Gly Tyr Gln Asp Lys Ile Glu Glu Ser Ser Gly Lys
 50 55 60

Val Ser Ala Thr Asp Thr Lys Leu Arg Ile Phe Glu Val Asn Asp Thr
 65 70 75 80

Ser Lys Leu Ser Asp Ser Tyr Tyr Ala Asp Pro Asn Asp Ser Asn Leu
 85 90 95

Lys Glu Val Thr Asp Gln Phe Lys Asn Arg Ile Tyr Tyr Glu His Pro
 100 105 110

Asn Val Ala Ser Ile Lys Phe Gly Asp Ile Thr Lys Thr Tyr Val Val
 115 120 125

Leu Val Glu Gly His Tyr Asp Asn Thr Gly Lys Asn Leu Lys Thr Gln
 130 135 140

Val Ile Gln Glu Asn Val Asp Pro Val Thr Asn Arg Asp Tyr Ser Ile
 145 150 155 160

Phe Gly Trp Asn Asn Glu Asn Val Val Arg Tyr Gly Gly Gly Ser Ala
 165 170 175

Asp Gly Asp Ser Ala Val Asn
 180

- <210> 8
- <211> 1166
- 5 <212> PRT
- <213> Staphylococcus aureus
- <400> 8

ES 2 626 416 T3

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

Ser Asn Arg Leu Asn Lys Phe Ser Ile Arg Lys Tyr Thr Val Gly Thr
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 626 416 T3

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

ES 2 626 416 T3

500					505					510					
Asp	Phe	Ser	Gln	Tyr	Glu	Asp	Val	Thr	Ser	Gln	Phe	Asp	Asn	Lys	Lys
		515					520					525			
Ser	Phe	Ser	Asn	Asn	Val	Ala	Thr	Leu	Asp	Phe	Gly	Asp	Ile	Asn	Ser
	530					535					540				
Ala	Tyr	Ile	Ile	Lys	Val	Val	Ser	Lys	Tyr	Thr	Pro	Thr	Ser	Asp	Gly
545					550					555					560
Glu	Leu	Asp	Ile	Ala	Gln	Gly	Thr	Ser	Met	Arg	Thr	Thr	Asp	Lys	Tyr
				565					570					575	
Gly	Tyr	Tyr	Asn	Tyr	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asn	Phe	Ile	Val	Thr	Ser	Asn
			580					585					590		
Asp	Thr	Gly	Gly	Gly	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Pro	Glu	Glu	Lys	Leu	Tyr
		595					600					605			
Lys	Ile	Gly	Asp	Tyr	Val	Trp	Glu	Asp	Val	Asp	Lys	Asp	Gly	Val	Gln
	610					615					620				
Gly	Thr	Asp	Ser	Lys	Glu	Lys	Pro	Met	Ala	Asn	Val	Leu	Val	Thr	Leu
625					630					635					640
Thr	Tyr	Pro	Asp	Gly	Thr	Thr	Lys	Ser	Val	Arg	Thr	Asp	Ala	Asn	Gly
				645					650					655	
His	Tyr	Glu	Phe	Gly	Gly	Leu	Lys	Asp	Gly	Glu	Thr	Tyr	Thr	Val	Lys
			660					665					670		
Phe	Glu	Thr	Pro	Thr	Gly	Tyr	Leu	Pro	Thr	Lys	Val	Asn	Gly	Thr	Thr
		675					680					685			
Asp	Gly	Glu	Lys	Asp	Ser	Asn	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Lys	Ile	Asn
	690					695					700				
Gly	Lys	Asp	Asp	Met	Ser	Leu	Asp	Thr	Gly	Phe	Tyr	Lys	Glu	Pro	Lys
705					710					715					720
Tyr	Asn	Leu	Gly	Asp	Tyr	Val	Trp	Glu	Asp	Thr	Asn	Lys	Asp	Gly	Ile
				725					730					735	
Gln	Asp	Ala	Asn	Glu	Pro	Gly	Ile	Lys	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Leu	Lys
			740					745					750		
Asp	Ser	Thr	Gly	Lys	Val	Ile	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Asp	Ala	Ser	Gly
		755					760					765			
Lys	Tyr	Lys	Phe	Thr	Asp	Leu	Asp	Asn	Gly	Asn	Tyr	Thr	Val	Glu	Phe
	770					775					780				
Glu	Thr	Pro	Ala	Gly	Tyr	Thr	Pro	Thr	Val	Lys	Asn	Thr	Thr	Ala	Asp
785					790					795					800
Asp	Lys	Asp	Ser	Asn	Gly	Leu	Thr	Thr	Thr	Gly	Val	Ile	Lys	Asp	Ala
				805					810					815	
Asp	Asn	Met	Thr	Leu	Asp	Arg	Gly	Phe	Tyr	Lys	Thr	Pro	Lys	Tyr	Ser
			820					825					830		

ES 2 626 416 T3

Leu Gly Asp Tyr Val Trp Tyr Asp Ser Asn Lys Asp Gly Lys Gln Asp
 835 840 845

Ser Thr Glu Lys Gly Ile Lys Asp Val Thr Val Thr Leu Gln Asn Glu
 850 855 860

Lys Gly Glu Val Ile Gly Thr Thr Lys Thr Asp Glu Asn Gly Lys Tyr
 865 870 875 880

Arg Phe Asp Asn Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Lys Val Ile Phe Glu Lys
 885 890 895

Pro Ala Gly Leu Thr Gln Thr Val Thr Asn Thr Thr Glu Asp Asp Lys
 900 905 910

Asp Ala Asp Gly Gly Glu Val Asp Val Thr Ile Thr Asp His Asp Asp
 915 920 925

Phe Thr Leu Asp Asn Gly Tyr Phe Glu Glu Asp Thr Ser Asp Ser Asp
 930 935 940

Ser Asp
 945 950 955 960

Ser Asp
 965 970 975

Ser Asp
 980 985 990

Ser Asp
 995 1000 1005

Ser Asp
 1010 1015 1020

Ser Asp
 1025 1030 1035 1040

Ser Asp
 1045 1050 1055

Ser Asp
 1060 1065 1070

Ser Asp
 1075 1080 1085

Ser Asp
 1090 1095 1100

Ser Asp Ala Gly Lys His Thr Pro Val Lys Pro Met Ser Thr Thr Lys
 1105 1110 1115 1120

Asp His His Asn Lys Ala Lys Ala Leu Pro Glu Thr Gly Ser Glu Asn
 1125 1130 1135

Asn Gly Ser Asn Asn Ala Thr Leu Phe Gly Gly Leu Phe Ala Ala Leu
 1140 1145 1150

ES 2 626 416 T3

Gly Ser Leu Leu Leu Phe Gly Arg Arg Lys Lys Gln Asn Lys
1155 1160 1165

5 <210> 9
<211> 580
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

10 <400> 9

ES 2 626 416 T3

Ala Glu Asn Thr Ser Thr Glu Asn Ala Lys Gln Asp Asp Ala Thr Thr
1 5 10 15

Ser Asp Asn Lys Glu Val Val Ser Glu Thr Glu Asn Asn Ser Thr Thr
20 25 30

Glu Asn Asn Ser Thr Asn Pro Ile Lys Lys Glu Thr Asn Thr Asp Ser
35 40 45

Gln Pro Glu Ala Lys Lys Glu Ser Thr Ser Ser Ser Thr Gln Lys Gln
50 55 60

Gln Asn Asn Val Thr Ala Thr Thr Glu Thr Lys Pro Gln Asn Ile Glu
65 70 75 80

Lys Glu Asn Val Lys Pro Ser Thr Asp Lys Thr Ala Thr Glu Asp Thr
85 90 95

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

Val Thr Thr Lys Pro Ser Thr Ser Glu Pro Ser Thr Ser Glu Ile Gln
115 120 125

Thr Lys Pro Thr Thr Pro Gln Glu Ser Thr Asn Ile Glu Asn Ser Gln
130 135 140

Pro Gln Pro Thr Pro Ser Lys Val Asp Asn Gln Val Thr Asp Ala Thr
145 150 155 160

Asn Pro Lys Glu Pro Val Asn Val Ser Lys Glu Glu Leu Lys Asn Asn
165 170 175

Pro Glu Lys Leu Lys Glu Leu Val Arg Asn Asp Ser Asn Thr Asp His
180 185 190

Ser Thr Lys Pro Val Ala Thr Ala Pro Thr Ser Val Ala Pro Lys Arg
195 200 205

Val Asn Ala Lys Met Arg Phe Ala Val Ala Gln Pro Ala Ala Val Ala
210 215 220

Ser Asn Asn Val Asn Asp Leu Ile Lys Val Thr Lys Gln Thr Ile Lys
225 230 235 240

Val Gly Asp Gly Lys Asp Asn Val Ala Ala Ala His Asp Gly Lys Asp
245 250 255

Ile Glu Tyr Asp Thr Glu Phe Thr Ile Asp Asn Lys Val Lys Lys Gly
260 265 270

Asp Thr Met Thr Ile Asn Tyr Asp Lys Asn Val Ile Pro Ser Asp Leu

ES 2 626 416 T3

	275		280		285														
Thr	Asp	Lys	Asn	Asp	Pro	Ile	Asp	Ile	Thr	Asp	Pro	Ser	Gly	Glu	Val				
	290					295					300								
Ile	Ala	Lys	Gly	Thr	Phe	Asp	Lys	Ala	Thr	Lys	Gln	Ile	Thr	Tyr	Thr				
	305				310					315					320				
Phe	Thr	Asp	Tyr	Val	Asp	Lys	Tyr	Glu	Asp	Ile	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr				
				325					330					335					
Leu	Tyr	Ser	Tyr	Ile	Asp	Lys	Lys	Thr	Val	Pro	Asn	Glu	Thr	Ser	Leu				
			340					345					350						
Asn	Leu	Thr	Phe	Ala	Thr	Ala	Gly	Lys	Glu	Thr	Ser	Gln	Asn	Val	Thr				
		355					360					365							
Val	Asp	Tyr	Gln	Asp	Pro	Met	Val	His	Gly	Asp	Ser	Asn	Ile	Gln	Ser				
	370					375					380								
Ile	Phe	Thr	Lys	Leu	Asp	Glu	Asp	Lys	Gln	Thr	Ile	Glu	Gln	Gln	Ile				
	385				390					395					400				
Tyr	Val	Asn	Pro	Leu	Lys	Lys	Ser	Ala	Thr	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Ile				
				405					410					415					
Ala	Gly	Ser	Gln	Val	Asp	Asp	Tyr	Gly	Asn	Ile	Lys	Leu	Gly	Asn	Gly				
			420					425					430						
Ser	Thr	Ile	Ile	Asp	Gln	Asn	Thr	Glu	Ile	Lys	Val	Tyr	Lys	Val	Asn				
		435					440					445							
Ser	Asp	Gln	Gln	Leu	Pro	Gln	Ser	Asn	Arg	Ile	Tyr	Asp	Phe	Ser	Gln				
	450					455					460								
Tyr	Glu	Asp	Val	Thr	Ser	Gln	Phe	Asp	Asn	Lys	Lys	Ser	Phe	Ser	Asn				
	465				470					475					480				
Asn	Val	Ala	Thr	Leu	Asp	Phe	Gly	Asp	Ile	Asn	Ser	Ala	Tyr	Ile	Ile				
				485					490					495					
Lys	Val	Val	Ser	Lys	Tyr	Thr	Pro	Thr	Ser	Asp	Gly	Glu	Leu	Asp	Ile				
			500					505					510						
Ala	Gln	Gly	Thr	Ser	Met	Arg	Thr	Thr	Asp	Lys	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Asn				
		515					520					525							
Tyr	Ala	Gly	Tyr	Ser	Asn	Phe	Ile	Val	Thr	Ser	Asn	Asp	Thr	Gly	Gly				
	530					535					540								
Gly	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Pro	Glu	Glu	Lys	Leu	Tyr	Lys	Ile	Gly	Asp				
	545				550					555					560				
Tyr	Val	Trp	Glu	Asp	Val	Asp	Lys	Asp	Gly	Val	Gln	Gly	Thr	Asp	Ser				
				565					570					575					
Lys	Glu	Lys	Pro																
			580																

<210> 10

5

<211> 995

<212> PRT

ES 2 626 416 T3

<213> Staphylococcus aureus
 <400> 10

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

ES 2 626 416 T3

Lys Arg Lys Asn Ala Thr Thr Asp Lys Thr Ala Tyr Lys Met Glu Val
 305 310 315 320
 Thr Leu Gly Asn Asp Thr Tyr Ser Glu Glu Ile Ile Val Asp Tyr Gly
 325 330 335
 Asn Lys Lys Ala Gln Pro Leu Ile Ser Ser Thr Asn Tyr Ile Asn Asn
 340 345 350
 Glu Asp Leu Ser Arg Asn Met Thr Ala Tyr Val Asn Gln Pro Lys Asn
 355 360 365
 Thr Tyr Thr Lys Gln Thr Phe Val Thr Asn Leu Thr Gly Tyr Lys Phe
 370 375 380
 Asn Pro Asn Ala Lys Asn Phe Lys Ile Tyr Glu Val Thr Asp Gln Asn
 385 390 395 400
 Gln Phe Val Asp Ser Phe Thr Pro Asp Thr Ser Lys Leu Lys Asp Val
 405 410 415
 Thr Asp Gln Phe Asp Val Ile Tyr Ser Asn Asp Asn Lys Thr Ala Thr
 420 425 430
 Val Asp Leu Met Lys Gly Gln Thr Ser Ser Asn Lys Gln Tyr Ile Ile
 435 440 445
 Gln Gln Val Ala Tyr Pro Asp Asn Ser Ser Thr Asp Asn Gly Lys Ile
 450 455 460
 Asp Tyr Thr Leu Asp Thr Asp Lys Thr Lys Tyr Ser Trp Ser Asn Ser
 465 470 475 480
 Tyr Ser Asn Val Asn Gly Ser Ser Thr Ala Asn Gly Asp Gln Lys Lys
 485 490 495
 Tyr Asn Leu Gly Asp Tyr Val Trp Glu Asp Thr Asn Lys Asp Gly Lys
 500 505 510
 Gln Asp Ala Asn Glu Lys Gly Ile Lys Gly Val Tyr Val Ile Leu Lys
 515 520 525
 Asp Ser Asn Gly Lys Glu Leu Asp Arg Thr Thr Thr Asp Glu Asn Gly
 530 535 540
 Lys Tyr Gln Phe Thr Gly Leu Ser Asn Gly Thr Tyr Ser Val Glu Phe
 545 550 555 560
 Ser Thr Pro Ala Gly Tyr Thr Pro Thr Thr Ala Asn Val Gly Thr Asp
 565 570 575
 Asp Ala Val Asp Ser Asp Gly Leu Thr Thr Thr Gly Val Ile Lys Asp
 580 585 590
 Ala Asp Asn Met Thr Leu Asp Ser Gly Phe Tyr Lys Thr Pro Lys Tyr
 595 600 605
 Ser Leu Gly Asp Tyr Val Trp Tyr Asp Ser Asn Lys Asp Gly Lys Gln
 610 615 620
 Asp Ser Thr Glu Lys Gly Ile Lys Gly Val Lys Val Thr Leu Gln Asn

ES 2 626 416 T3

625					630					635				640	
Glu	Lys	Gly	Glu	Val	Ile	Gly	Thr	Thr	Glu	Thr	Asp	Glu	Asn	Gly	Lys
				645					650					655	
Tyr	Arg	Phe	Asp	Asn	Leu	Asp	Ser	Gly	Lys	Tyr	Lys	Val	Ile	Phe	Glu
			660					665					670		
Lys	Pro	Ala	Gly	Leu	Thr	Gln	Thr	Gly	Thr	Asn	Thr	Thr	Glu	Asp	Asp
		675					680					685			
Lys	Asp	Ala	Asp	Gly	Gly	Glu	Val	Asp	Val	Thr	Ile	Thr	Asp	His	Asp
	690					695					700				
Asp	Phe	Thr	Leu	Asp	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Glu	Glu	Glu	Thr	Ser	Asp	Ser
705					710				715						720
Asp	Ser														
				725					730					735	
Asp	Ser														
			740					745					750		
Asp	Ser														
		755					760					765			
Asp	Ser														
770						775					780				
Asp	Ser														
785					790					795					800
Asp	Ser														
				805					810					815	
Asp	Ser														
			820					825					830		
Asp	Ser														
		835					840					845			
Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Asn	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser
850						855					860				
Asp	Ser														
865					870					875					880
Asp	Ser														
				885					890					895	
Asp	Ser														
			900					905					910		
Asp	Ser	Asp	Asn	Asp	Ser	Asp	Ser								
		915					920					925			
Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ala	Gly	Lys	His	Thr	Pro	Ala	Lys	Pro
930						935					940				
Met	Ser	Thr	Val	Lys	Asp	Gln	His	Lys	Thr	Ala	Lys	Ala	Leu	Pro	Glu
945					950					955					960

ES 2 626 416 T3

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

ES 2 626 416 T3

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

5 <210> 12
 <211> 635
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 12

ES 2 626 416 T3

50						55										60
Gln	Ile	Glu	Gln	Leu	Lys	Gln	Leu	Ser	Ala	Ser	Ser	Lys	Glu	His	Tyr	
65					70					75					80	
Lys	Ala	Gln	Leu	Asn	Glu	Ala	Lys	Thr	Ala	Ser	Gln	Ile	Asp	Glu	Ile	
				85					90					95		
Ile	Lys	Arg	Ala	Asn	Glu	Leu	Asp	Ser	Lys	Asp	Asn	Lys	Ser	Ser	His	
			100					105					110			
Thr	Glu	Met	Asn	Gly	Gln	Ser	Asp	Ile	Asp	Ser	Lys	Leu	Asp	Gln	Leu	
		115					120					125				
Leu	Lys	Asp	Leu	Asn	Glu	Val	Ser	Ser	Asn	Val	Asp	Arg	Gly	Gln	Gln	
	130					135					140					
Ser	Gly	Glu	Asp	Asp	Leu	Asn	Ala	Met	Lys	Asn	Asp	Met	Ser	Gln	Thr	
145					150					155					160	
Ala	Thr	Thr	Lys	His	Gly	Glu	Lys	Asp	Asp	Lys	Asn	Asp	Glu	Ala	Met	
				165					170						175	
Val	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Asp	His	Leu	Asn	Gln	Gln	Ile	His	
			180					185					190			
Lys	Ser	Lys	Asp	Ala	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Glu	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	
		195					200					205				
Thr	Thr	Asp	Asn	Asn	His	Glu	Val	Ala	Lys	Thr	Pro	Asn	Asn	Asp	Gly	
	210					215					220					
Ser	Gly	His	Val	Val	Leu	Asn	Lys	Phe	Leu	Ser	Asn	Glu	Glu	Asn	Gln	
225					230					235					240	
Ser	His	Ser	Asn	Arg	Leu	Thr	Asp	Lys	Leu	Gln	Gly	Ser	Asp	Lys	Ile	
				245					250					255		
Asn	His	Ala	Met	Ile	Glu	Lys	Leu	Ala	Lys	Ser	Asn	Ala	Ser	Thr	Gln	
			260					265					270			
His	Tyr	Thr	Tyr	His	Lys	Leu	Asn	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Asp	Gln	Arg	
		275					280						285			
Ile	Ala	Asn	Thr	Gln	Leu	Pro	Lys	Asn	Gln	Lys	Ser	Asp	Leu	Met	Ser	
	290					295					300					
Glu	Val	Asn	Lys	Thr	Lys	Glu	Arg	Ile	Lys	Ser	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	
305					310					315					320	
Leu	Glu	Glu	Leu	Ala	Arg	Thr	Asp	Asp	Lys	Lys	Tyr	Ala	Thr	Gln	Ser	
				325					330					335		
Ile	Leu	Glu	Ser	Ile	Phe	Asn	Lys	Asp	Glu	Ala	Val	Lys	Ile	Leu	Lys	
			340					345					350			
Asp	Ile	Arg	Val	Asp	Gly	Lys	Thr	Asp	Gln	Gln	Ile	Ala	Asp	Gln	Ile	
		355					360					365				
Thr	Arg	His	Ile	Asp	Gln	Leu	Ser	Leu	Thr	Thr	Ser	Asp	Asp	Leu	Leu	
	370					375						380				

ES 2 626 416 T3

Thr Ser Leu Ile Asp Gln Ser Gln Asp Lys Ser Leu Leu Ile Ser Gln
 385 390 395 400

Ile Leu Gln Thr Lys Leu Gly Lys Ala Glu Ala Asp Lys Leu Ala Lys
 405 410 415

Asp Trp Thr Asn Lys Gly Leu Ser Asn Arg Gln Ile Val Asp Gln Leu
 420 425 430

Lys Lys His Phe Ala Ser Thr Gly Asp Thr Ser Ser Asp Asp Ile Leu
 435 440 445

Lys Ala Ile Leu Asn Asn Ala Lys Asp Lys Lys Gln Ala Ile Glu Thr
 450 455 460

Ile Leu Ala Thr Arg Ile Glu Arg Gln Lys Ala Lys Leu Leu Ala Asp
 465 470 475 480

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

Lys Ser Ala Leu Asn Gly Lys Ala Asp Asp Leu Leu Asn Leu Gln Lys
 500 505 510

Arg Leu Asn Gln Thr Lys Lys Asp Ile Asp Tyr Ile Leu Ser Pro Ile
 515 520 525

Val Asn Arg Pro Ser Leu Leu Asp Arg Leu Asn Lys Asn Gly Lys Thr
 530 535 540

Thr Asp Leu Asn Lys Leu Ala Asn Leu Met Asn Gln Gly Ser Asp Leu
 545 550 555 560

Leu Asp Ser Ile Pro Asp Ile Pro Thr Pro Lys Pro Glu Lys Thr Leu
 565 570 575

Thr Leu Gly Lys Gly Asn Gly Leu Leu Ser Gly Leu Leu Asn Ala Asp
 580 585 590

Gly Asn Val Ser Leu Pro Lys Ala Gly Glu Thr Ile Lys Glu His Trp
 595 600 605

Leu Pro Ile Ser Val Ile Val Gly Ala Met Gly Val Leu Met Ile Trp
 610 615 620

Leu Ser Arg Arg Asn Lys Leu Lys Asn Lys Ala
 625 630 635

5 <210> 13
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 13

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

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

ES 2 626 416 T3

Asp Lys Lys Phe Val Val Pro Glu Ser Gly Ile Asn Lys Ile Ile Pro
 35 40 45
 Ala Tyr Asp Glu Phe Lys Asn Ser Pro Lys Val Asn Val Ser Asn Leu
 50 55 60
 Thr Asp Asn Lys Asn Phe Val Ala Ser Glu Asp Lys Leu Asn Lys Ile
 65 70 75 80
 Ala Asp Ser Ser Ala Ala Ser Lys Ile Val Asp Lys Asn Phe Val Val
 85 90 95
 Pro Glu Ser Lys Leu Gly Asn Ile Val Pro Glu Tyr Lys Glu Ile Asn
 100 105 110
 Asn Arg Val Asn Val Ala Thr Asn Asn Pro Ala Ser Gln Gln Val Asp
 115 120 125
 Lys His Phe Val Ala Lys Gly Pro Glu Val Asn Arg Phe Ile Thr Gln
 130 135 140
 Asn Lys Val Asn His His Phe Ile Thr Thr Gln Thr His Tyr Lys Lys
 145 150 155 160
 Val Ile Thr Ser Tyr Lys Ser Thr His Val His Lys His Val Asn His
 165 170 175
 Ala Lys Asp Ser Ile Asn Lys His Phe Ile Val Lys Pro Ser Glu Ser
 180 185 190
 Pro Arg Tyr Thr His Pro Ser Gln Ser Leu Ile Ile Lys His His Phe
 195 200 205
 Ala Val Pro Gly Tyr His Ala His Lys Phe Val Thr Pro Gly His Ala
 210 215 220
 Ser Ile Lys Ile Asn His Phe Cys Val Val Pro Gln Ile Asn Ser Phe
 225 230 235 240
 Lys Val Ile Pro Pro Tyr Gly His Asn Ser His Arg Met His Val Pro
 245 250 255
 Ser Phe Gln Asn Asn Thr Thr Ala Thr His Gln Asn Ala Lys Val Asn
 260 265 270
 Lys Ala Tyr Asp Tyr Lys Tyr Phe Tyr Ser Tyr Lys Val Val Lys Gly
 275 280 285
 Val Lys Lys Tyr Phe Ser Phe Ser Gln Ser Asn Gly Tyr Lys Ile Gly
 290 295 300
 Lys Pro Ser Leu Asn Ile Lys Asn Val Asn Tyr Gln Tyr Ala Val Pro
 305 310 315 320
 Ser Tyr Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu Phe Lys Gly Ser Leu Pro
 325 330 335
 Ala Pro Arg Val
 340

ES 2 626 416 T3

<210> 14
 <211> 306
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

5

<400> 14

```

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

Arg Val
305

5 <210> 15
<211> 308
<212> PRT
<213> Staphylococcus aureus

10 <400> 15

ES 2 626 416 T3

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

Ile Asn Lys Ile Ile Pro Ala Tyr Asp Glu Phe Lys Asn Ser Pro Lys
20 25 30

Val Asn Val Ser Asn Leu Thr Asp Asn Lys Asn Phe Val Ala Ser Glu
35 40 45

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

Asp Lys Asn Phe Val Val Pro Glu Ser Lys Leu Gly Asn Ile Val Pro
65 70 75 80

Glu Tyr Lys Glu Ile Asn Asn Arg Val Asn Val Ala Thr Asn Asn Pro
85 90 95

Ala Ser Gln Gln Val Asp Lys His Phe Val Ala Lys Gly Pro Glu Val
100 105 110

Asn Arg Phe Ile Thr Gln Asn Lys Val Asn His His Phe Ile Thr Thr
115 120 125

Gln Thr His Tyr Lys Lys Val Ile Thr Ser Tyr Lys Ser Thr His Val
130 135 140

His Lys His Val Asn His Ala Lys Asp Ser Ile Asn Lys His Phe Ile
145 150 155 160

Val Lys Pro Ser Glu Ser Pro Arg Tyr Thr His Pro Ser Gln Ser Leu
165 170 175

Ile Ile Lys His His Phe Ala Val Pro Gly Tyr His Ala His Lys Phe
180 185 190

Val Thr Pro Gly His Ala Ser Ile Lys Ile Asn His Phe Cys Val Val
195 200 205

Pro Gln Ile Asn Ser Phe Lys Val Ile Pro Pro Tyr Gly His Asn Ser
210 215 220

His Arg Met His Val Pro Ser Phe Gln Asn Asn Thr Thr Ala Thr His
225 230 235 240

Gln Asn Ala Lys Val Asn Lys Ala Tyr Asp Tyr Lys Tyr Phe Tyr Ser
245 250 255

Tyr Lys Val Val Lys Gly Val Lys Lys Tyr Phe Ser Phe Ser Gln Ser
260 265 270

Asn Gly Tyr Lys Ile Gly Lys Pro Ser Leu Asn Ile Lys Asn Val Asn
275 280 285

Tyr Gln Tyr Ala Val Pro Ser Tyr Ser Pro Thr His Tyr Val Pro Glu
290 295 300

Phe Lys Gly Ser
305

ES 2 626 416 T3

<210> 16
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

5

<400> 16

```

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

ES 2 626 416 T3

				245					250					255		
Lys	Tyr	Phe	Ser	Phe	Ser	Gln	Ser	Asn	Gly	Tyr	Lys	Ile	Gly	Lys	Pro	
			260					265					270			
Ser	Leu	Asn	Ile	Lys	Asn	Val	Asn	Tyr	Gln	Tyr	Ala	Val	Pro	Ser	Tyr	
		275					280					285				
Ser	Pro	Thr	His	Tyr	Val	Pro	Glu	Phe	Lys	Gly	Ser					
	290					295					300					

5 <210> 17
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 17

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

15 <210> 18
 <211> 1349
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 18

ES 2 626 416 T3

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

ES 2 626 416 T3

Leu Asn Gln Glu Asp Asn Thr Lys Asn Asp Asn Gln Lys Glu Met Val
 85 90 95
 Ser Ser Gln Gly Asn Glu Thr Thr Ser Asn Gly Asn Lys Leu Ile Glu
 100 105 110
 Lys Glu Ser Val Gln Ser Thr Thr Gly Asn Lys Val Glu Val Ser Thr
 115 120 125
 Ala Lys Ser Asp Glu Gln Ala Ser Pro Lys Ser Thr Asn Glu Asp Leu
 130 135 140
 Asn Thr Lys Gln Thr Ile Ser Asn Gln Glu Ala Leu Gln Pro Asp Leu
 145 150 155 160
 Gln Glu Asn Lys Ser Val Val Asn Val Gln Pro Thr Asn Glu Glu Asn
 165 170 175
 Lys Lys Val Asp Ala Lys Thr Glu Ser Thr Thr Leu Asn Val Lys Ser
 180 185 190
 Asp Ala Ile Lys Ser Asn Asp Glu Thr Leu Val Asp Asn Asn Ser Asn
 195 200 205
 Ser Asn Asn Glu Asn Asn Ala Asp Ile Ile Leu Pro Lys Ser Thr Ala
 210 215 220
 Pro Lys Arg Leu Asn Thr Arg Met Arg Ile Ala Ala Val Gln Pro Ser
 225 230 235 240
 Ser Thr Glu Ala Lys Asn Val Asn Asp Leu Ile Thr Ser Asn Thr Thr
 245 250 255
 Leu Thr Val Val Asp Ala Asp Lys Asn Asn Lys Ile Val Pro Ala Gln
 260 265 270
 Asp Tyr Leu Ser Leu Lys Ser Gln Ile Thr Val Asp Asp Lys Val Lys
 275 280 285
 Ser Gly Asp Tyr Phe Thr Ile Lys Tyr Ser Asp Thr Val Gln Val Tyr
 290 295 300
 Gly Leu Asn Pro Glu Asp Ile Lys Asn Ile Gly Asp Ile Lys Asp Pro
 305 310 315 320
 Asn Asn Gly Glu Thr Ile Ala Thr Ala Lys His Asp Thr Ala Asn Asn
 325 330 335
 Leu Ile Thr Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp Arg Phe Asn Ser Val
 340 345 350
 Gln Met Gly Ile Asn Tyr Ser Ile Tyr Met Asp Ala Asp Thr Ile Pro
 355 360 365
 Val Ser Lys Asn Asp Val Glu Phe Asn Val Thr Ile Gly Asn Thr Thr
 370 375 380
 Thr Lys Thr Thr Ala Asn Ile Gln Tyr Pro Asp Tyr Val Val Asn Glu
 385 390 395 400

ES 2 626 416 T3

Lys Asn Ser Ile Gly Ser Ala Phe Thr Glu Thr Val Ser His Val Gly
 405 410 415
 Asn Lys Glu Asn Pro Gly Tyr Tyr Lys Gln Thr Ile Tyr Val Asn Pro
 420 425 430
 Ser Glu Asn Ser Leu Thr Asn Ala Lys Leu Lys Val Gln Ala Tyr His
 435 440 445
 Ser Ser Tyr Pro Asn Asn Ile Gly Gln Ile Asn Lys Asp Val Thr Asp
 450 455 460
 Ile Lys Ile Tyr Gln Val Pro Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Lys Gly Tyr
 465 470 475 480
 Asp Val Asn Thr Lys Glu Leu Thr Asp Val Thr Asn Gln Tyr Leu Gln
 485 490 495
 Lys Ile Thr Tyr Gly Asp Asn Asn Ser Ala Val Ile Asp Phe Gly Asn
 500 505 510
 Ala Asp Ser Ala Tyr Val Val Met Val Asn Thr Lys Phe Gln Tyr Thr
 515 520 525
 Asn Ser Glu Ser Pro Thr Leu Val Gln Met Ala Thr Leu Ser Ser Thr
 530 535 540
 Gly Asn Lys Ser Val Ser Thr Gly Asn Ala Leu Gly Phe Thr Asn Asn
 545 550 555 560
 Gln Ser Gly Gly Ala Gly Gln Glu Val Tyr Lys Ile Gly Asn Tyr Val
 565 570 575
 Trp Glu Asp Thr Asn Lys Asn Gly Val Gln Glu Leu Gly Glu Lys Gly
 580 585 590
 Val Gly Asn Val Thr Val Thr Val Phe Asp Asn Asn Thr Asn Thr Lys
 595 600 605
 Val Gly Glu Ala Val Thr Lys Glu Asp Gly Ser Tyr Leu Ile Pro Asn
 610 615 620
 Leu Pro Asn Gly Asp Tyr Arg Val Glu Phe Ser Asn Leu Pro Lys Gly
 625 630 635 640
 Tyr Glu Val Thr Pro Ser Lys Gln Gly Asn Asn Glu Glu Leu Asp Ser
 645 650 655
 Asn Gly Leu Ser Ser Val Ile Thr Val Asn Gly Lys Asp Asn Leu Ser
 660 665 670
 Ala Asp Leu Gly Ile Tyr Lys Pro Lys Tyr Asn Leu Gly Asp Tyr Val
 675 680 685
 Trp Glu Asp Thr Asn Lys Asn Gly Ile Gln Asp Gln Asp Glu Lys Gly
 690 695 700
 Ile Ser Gly Val Thr Val Thr Leu Lys Asp Glu Asn Gly Asn Val Leu
 705 710 715 720
 Lys Thr Val Thr Thr Asp Ala Asp Gly Lys Tyr Lys Phe Thr Asp Leu

ES 2 626 416 T3

Thr Asp Glu Asn Gly Lys Tyr Cys Phe Asp Asn Leu Asp Ser Gly Lys
 1060 1065 1070

Tyr Lys Val Ile Phe Glu Lys Pro Ala Gly Leu Thr Gln Thr Val Thr
 1075 1080 1085

Asn Thr Thr Glu Asp Asp Lys Asp Ala Asp Gly Gly Glu Val Asp Val
 1090 1095 1100

Thr Ile Thr Asp His Asp Asp Phe Thr Leu Asp Asn Gly Tyr Phe Glu
 1105 1110 1115 1120

Glu Asp Thr Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser
 1125 1130 1135

Asp Ser
 1140 1145 1150

Asp Ser
 1155 1160 1165

Asp Ser
 1170 1175 1180

Asp Ser
 1185 1190 1195 1200

Asp Ser
 1205 1210 1215

Asp Ser
 1220 1225 1230

Asp Ser
 1235 1240 1245

Asp Ser
 1250 1255 1260

Asp Ser
 1265 1270 1275 1280

Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ala Gly Lys His Thr Pro Val
 1285 1290 1295

Lys Pro Met Ser Thr Thr Lys Asp His His Asn Lys Ala Lys Ala Leu
 1300 1305 1310

Pro Glu Thr Gly Ser Glu Asn Asn Gly Ser Asn Asn Ala Thr Leu Phe
 1315 1320 1325

Gly Gly Leu Phe Ala Ala Leu Gly Ser Leu Leu Leu Phe Gly Arg Arg
 1330 1335 1340

Lys Lys Gln Asn Lys
 1345

5 <210> 19
 <211> 540
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 19

ES 2 626 416 T3

Ala Glu Ser Thr Asn Lys Glu Leu Asn Glu Ala Thr Thr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Asp Asn Gln Ser Ser Asp Lys Val Asp Met Gln Gln Leu Asn Gln Glu
20 25 30

Asp Asn Thr Lys Asn Asp Asn Gln Lys Glu Met Val Ser Ser Gln Gly
35 40 45

Asn Glu Thr Thr Ser Asn Gly Asn Lys Leu Ile Glu Lys Glu Ser Val
50 55 60

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

Glu Gln Ala Ser Pro Lys Ser Thr Asn Glu Asp Leu Asn Thr Lys Gln
85 90 95

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

Ser Val Val Asn Val Gln Pro Thr Asn Glu Glu Asn Lys Lys Val Asp
115 120 125

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

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

Asn Asn Ala Asp Ile Ile Leu Pro Lys Ser Thr Ala Pro Lys Arg Leu
165 170 175

Asn Thr Arg Met Arg Ile Ala Ala Val Gln Pro Ser Ser Thr Glu Ala
180 185 190

Lys Asn Val Asn Asp Leu Ile Thr Ser Asn Thr Thr Leu Thr Val Val
195 200 205

Asp Ala Asp Lys Asn Asn Lys Ile Val Pro Ala Gln Asp Tyr Leu Ser
210 215 220

Leu Lys Ser Gln Ile Thr Val Asp Asp Lys Val Lys Ser Gly Asp Tyr
225 230 235 240

Phe Thr Ile Lys Tyr Ser Asp Thr Val Gln Val Tyr Gly Leu Asn Pro
245 250 255

Glu Asp Ile Lys Asn Ile Gly Asp Ile Lys Asp Pro Asn Asn Gly Glu
260 265 270

Thr Ile Ala Thr Ala Lys His Asp Thr Ala Asn Asn Leu Ile Thr Tyr
275 280 285

Thr Phe Thr Asp Tyr Val Asp Arg Phe Asn Ser Val Gln Met Gly Ile
290 295 300

Asn Tyr Ser Ile Tyr Met Asp Ala Asp Thr Ile Pro Val Ser Lys Asn

ES 2 626 416 T3

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

<210> 20
 5 <211> 199
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 20

10

ES 2 626 416 T3

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

5 <210> 21
 <211> 516
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 21

ES 2 626 416 T3

Met Lys Lys Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Arg Lys Leu Gly Val Gly Ile
 1 5 10 15

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

Ala Ala Asn Ala Ala Gln His Asp Glu Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr
 35 40 45

Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe
 50 55 60

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly
 65 70 75 80

Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Ala Asp Ala Gln
 85 90 95

Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu
 100 105 110

Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser
 115 120 125

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

ES 2 626 416 T3

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

ES 2 626 416 T3

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

- <210> 23
- 5 <211> 130
- <212> PRT
- <213> Staphylococcus aureus
- <400> 23

ES 2 626 416 T3

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

- <210> 24
- <211> 97
- 5 <212> PRT
- <213> Staphylococcus aureus
- <400> 24

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

- 10
- <210> 25
- <211> 104
- <212> PRT
- 15 <213> Staphylococcus aureus
- <400> 25

ES 2 626 416 T3

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

<210> 26
 <211> 302
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

5

<400> 26

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

10

ES 2 626 416 T3

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

<210> 27

<211> 227

5 <212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 27

ES 2 626 416 T3

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

- <210> 28
- <211> 319
- 5 <212> PRT
- <213> Staphylococcus aureus

<400> 28

ES 2 626 416 T3

Met Lys Thr Arg Ile Val Ser Ser Val Thr Thr Thr Leu Leu Leu Gly
1 5 10 15
Ser Ile Leu Met Asn Pro Val Ala Asn Ala Ala Asp Ser Asp Ile Asn
20 25 30
Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser Asn Thr Thr Val Lys Thr
35 40 45
Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn Gly Met His Lys Lys Val
50 55 60
Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His Asn Lys Lys Leu Leu Val
65 70 75 80
Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln Tyr Arg Val Tyr Ser Glu
85 90 95
Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp Pro Ser Ala Phe Lys Val
100 105 110
Gln Leu Gln Leu Pro Asp Asn Glu Val Ala Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr
115 120 125
Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu Tyr Met Ser Thr Leu Thr Tyr
130 135 140
Gly Phe Asn Gly Asn Val Thr Gly Asp Asp Thr Gly Lys Ile Gly Gly
145 150 155 160
Leu Ile Gly Ala Asn Val Ser Ile Gly His Thr Leu Lys Tyr Val Gln
165 170 175
Pro Asp Phe Lys Thr Ile Leu Glu Ser Pro Thr Asp Lys Lys Val Gly
180 185 190
Trp Lys Val Ile Phe Asn Asn Met Val Asn Gln Asn Trp Gly Pro Tyr
195 200 205
Asp Arg Asp Ser Trp Asn Pro Val Tyr Gly Asn Gln Leu Phe Met Lys
210 215 220
Thr Arg Asn Gly Ser Met Lys Ala Ala Asp Asn Phe Leu Asp Pro Asn
225 230 235 240
Lys Ala Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Phe Ser Pro Asp Phe Ala Thr
245 250 255
Val Ile Thr Met Asp Arg Lys Ala Ser Lys Gln Gln Thr Asn Ile Asp
260 265 270
Val Ile Tyr Glu Arg Val Arg Asp Asp Tyr Gln Leu His Trp Thr Ser
275 280 285
Thr Asn Trp Lys Gly Thr Asn Thr Lys Asp Lys Trp Ile Asp Arg Ser
290 295 300
Ser Glu Arg Tyr Lys Ile Asp Trp Glu Lys Glu Glu Met Thr Asn
305 310 315

ES 2 626 416 T3

<210> 29
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

5

<400> 29

```

Ala Asp Ser Asp Ile Asn Ile Lys Thr Gly Thr Thr Asp Ile Gly Ser
 1          5          10          15

Asn Thr Thr Val Lys Thr Gly Asp Leu Val Thr Tyr Asp Lys Glu Asn
 20          25          30

Gly Met Leu Lys Lys Val Phe Tyr Ser Phe Ile Asp Asp Lys Asn His
 35          40          45

Asn Lys Lys Leu Leu Val Ile Arg Thr Lys Gly Thr Ile Ala Gly Gln
 50          55          60

Tyr Arg Val Tyr Ser Glu Glu Gly Ala Asn Lys Ser Gly Leu Ala Trp
 65          70          75          80

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

Gln Ile Ser Asp Tyr Tyr Pro Arg Asn Ser Ile Asp Thr Lys Glu Tyr
    
```

ES 2 626 416 T3

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

5 <210> 30
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Reemplazo de bucle tetrapeptídico
 <400> 30

Pro Ser Gly Ser
 1

15 <210> 31
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

20 <400> 31

ES 2 626 416 T3

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

<210> 32
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 32

10

ES 2 626 416 T3

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

- 5 <210> 33
- <211> 50
- <212> PRT
- <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 33

ES 2 626 416 T3

```

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

```

5 <210> 34
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 34

```

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

```

15 <210> 35
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 35

```

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

```

20 <210> 36
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

25 <400> 36

ES 2 626 416 T3

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

5 <210> 37
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 37

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

15 <210> 38
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 38

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

20 <210> 39
 <211> 256
 <212> PRT
 25 <213> Staphylococcus aureus

<400> 39

ES 2 626 416 T3

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

<210> 40

<211> 256

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 40

5

ES 2 626 416 T3

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

5 <210> 41
 <211> 256
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus
 10 <400> 41

ES 2 626 416 T3

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

- <210> 42
- 5 <211> 256
- <212> PRT
- <213> Staphylococcus aureus
- <400> 42
- 10

ES 2 626 416 T3

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

5 <210> 43
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 43

ES 2 626 416 T3

Met Thr Lys His Tyr Leu Asn Ser Lys Tyr Gln Ser Glu Gln Arg Ser
1 5 10 15

Ser Ala Met Lys Lys Ile Thr Met Gly Thr Ala Ser Ile Ile Leu Gly
20 25 30

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

Glu Ala Thr Asn Ala Thr Asn Asn Gln Ser Thr Gln Val Ser Gln Ala
50 55 60

Thr Ser Gln Pro Ile Asn Phe Gln Val Gln Lys Asp Gly Ser Ser Glu
65 70 75 80

Lys Ser His Met Asp Asp Tyr Met Gln His Pro Gly Lys Val Ile Lys
85 90 95

Gln Asn Asn Lys Tyr Tyr Phe Gln Thr Val Leu Asn Asn Ala Ser Phe
100 105 110

Trp Lys Glu Tyr Lys Phe Tyr Asn Ala Asn Asn Gln Glu Leu Ala Thr
115 120 125

Thr Val Val Asn Asp Asn Lys Lys Ala Asp Thr Arg Thr Ile Asn Val
130 135 140

Ala Val Glu Pro Gly Tyr Lys Ser Leu Thr Thr Lys Val His Ile Val
145 150 155 160

Val Pro Gln Ile Asn Tyr Asn His Arg Tyr Thr Thr His Leu Glu Phe
165 170 175

Glu Lys Ala Ile Pro Thr Leu Ala Asp Ala Ala Lys Pro Asn Asn Val
180 185 190

Lys Pro Val Gln Pro Lys Pro Ala Gln Pro Lys Thr Pro Thr Glu Gln
195 200 205

Thr Lys Pro Val Gln Pro Lys Val Glu Lys Val Lys Pro Thr Val Thr
210 215 220

Thr Thr Ser Lys Val Glu Asp Asn His Ser Thr Lys Val Val Ser Thr
225 230 235 240

Asp Thr Thr Lys Asp Gln Thr Lys Thr Gln Thr Ala His Thr Val Lys
245 250 255

Thr Ala Gln Thr Ala Gln Glu Gln Asn Lys Val Gln Thr Pro Val Lys
260 265 270

Asp Val Ala Thr Ala Lys Ser Glu Ser Asn Asn Gln Ala Val Ser Asp
275 280 285

Asn Lys Ser Gln Gln Thr Asn Lys Val Thr Lys His Asn Glu Thr Pro

ES 2 626 416 T3

```

                290                295                300
Lys Gln Ala Ser Lys Ala Lys Glu Leu Pro Lys Thr Gly Leu Thr Ser
305                310                315                320
Val Asp Asn Phe Ile Ser Thr Val Ala Phe Ala Thr Leu Ala Leu Leu
                325                330                335
Gly Ser Leu Ser Leu Leu Leu Phe Lys Arg Lys Glu Ser Lys
                340                345                350

```

5 <210> 44
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 44

```

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

```

15 <210> 45
 <211> 645
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus
 <400> 45

ES 2 626 416 T3

Asn Thr Glu Ala Gln Pro Lys Thr Glu Ala Val Ala Ser Pro Thr Thr
 50 55 60
 Thr Ser Glu Lys Ala Pro Glu Thr Lys Pro Val Ala Asn Ala Val Ser
 65 70 75 80
 Val Ser Asn Lys Glu Val Glu Ala Pro Thr Ser Glu Thr Lys Glu Ala
 85 90 95
 Lys Glu Val Lys Glu Val Lys Ala Pro Lys Glu Thr Lys Glu Val Lys
 100 105 110
 Pro Ala Ala Lys Ala Thr Asn Asn Thr Tyr Pro Ile Leu Asn Gln Glu
 115 120 125
 Leu Arg Glu Ala Ile Lys Asn Pro Ala Ile Lys Asp Lys Asp His Ser
 130 135 140
 Ala Pro Asn Ser Arg Pro Ile Asp Phe Glu Met Lys Lys Lys Asp Gly
 145 150 155 160
 Thr Gln Gln Phe Tyr His Tyr Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Arg Val
 165 170 175
 Ile Phe Thr Asp Ser Lys Pro Glu Ile Glu Leu Gly Leu Gln Ser Gly
 180 185 190
 Gln Phe Trp Arg Lys Phe Glu Val Tyr Glu Gly Asp Lys Lys Leu Pro
 195 200 205
 Ile Lys Leu Val Ser Tyr Asp Thr Val Lys Asp Tyr Ala Tyr Ile Arg
 210 215 220
 Phe Ser Val Ser Asn Gly Thr Lys Ala Val Lys Ile Val Ser Ser Thr
 225 230 235 240
 His Phe Asn Asn Lys Glu Glu Lys Tyr Asp Tyr Thr Leu Met Glu Phe
 245 250 255
 Ala Gln Pro Ile Tyr Asn Ser Ala Asp Lys Phe Lys Thr Glu Glu Asp
 260 265 270
 Tyr Lys Ala Glu Lys Leu Leu Ala Pro Tyr Lys Lys Ala Lys Thr Leu
 275 280 285
 Glu Arg Gln Val Tyr Glu Leu Asn Lys Ile Gln Asp Lys Leu Pro Glu
 290 295 300
 Lys Leu Lys Ala Glu Tyr Lys Lys Lys Leu Glu Asp Thr Lys Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Asp Glu Gln Val Lys Ser Ala Ile Thr Glu Phe Gln Asn Val Gln
 325 330 335
 Pro Thr Asn Glu Lys Met Thr Asp Leu Gln Asp Thr Lys Tyr Val Val
 340 345 350
 Tyr Glu Ser Val Glu Asn Asn Glu Ser Met Met Asp Thr Phe Val Lys
 355 360 365

ES 2 626 416 T3

His Pro Ile Lys Thr Gly Met Leu Asn Gly Lys Lys Tyr Met Val Met
 370 375 380
 Glu Thr Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Lys Asp Phe Met Val Glu Gly Gln
 385 390 395 400
 Arg Val Arg Thr Ile Ser Lys Asp Ala Lys Asn Asn Thr Arg Thr Ile
 405 410 415
 Ile Phe Pro Tyr Val Glu Gly Lys Thr Leu Tyr Asp Ala Ile Val Lys
 420 425 430
 Val His Val Lys Thr Ile Asp Tyr Asp Gly Gln Tyr His Val Arg Ile
 435 440 445
 Val Asp Lys Glu Ala Phe Thr Lys Ala Asn Thr Asp Lys Ser Asn Lys
 450 455 460
 Lys Glu Gln Gln Asp Asn Ser Ala Lys Lys Glu Ala Thr Pro Ala Thr
 465 470 475 480
 Pro Ser Lys Pro Thr Pro Ser Pro Val Glu Lys Glu Ser Gln Lys Gln
 485 490 495
 Asp Ser Gln Lys Asp Asp Asn Lys Gln Leu Pro Ser Val Glu Lys Glu
 500 505 510
 Asn Asp Ala Ser Ser Glu Ser Gly Lys Asp Lys Thr Pro Ala Thr Lys
 515 520 525
 Pro Thr Lys Gly Glu Val Glu Ser Ser Ser Thr Thr Pro Thr Lys Val
 530 535 540
 Val Ser Thr Thr Gln Asn Val Ala Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ser Lys
 545 550 555 560
 Thr Thr Lys Asp Val Val Gln Thr Ser Ala Gly Ser Ser Glu Ala Lys
 565 570 575
 Asp Ser Ala Pro Leu Gln Lys Ala Asn Ile Lys Asn Thr Asn Asp Gly
 580 585 590
 His Thr Gln Ser Gln Asn Asn Lys Asn Thr Gln Glu Asn Lys Ala Lys
 595 600 605
 Ser Leu Pro Gln Thr Gly Glu Glu Ser Asn Lys Asp Met Thr Leu Pro
 610 615 620
 Leu Met Ala Leu Leu Ala Leu Ser Ser Ile Val Ala Phe Val Leu Pro
 625 630 635 640
 Arg Lys Arg Lys Asn
 645

5 <210> 46
 <211> 1256
 <212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

10 <400> 46

ES 2 626 416 T3

Met Ala Lys Lys Phe Asn Tyr Lys Leu Pro Ser Met Val Ala Leu Thr

ES 2 626 416 T3

1				5						10					15
Leu	Val	Gly	Ser	Ala	Val	Thr	Ala	His	Gln	Val	Gln	Ala	Ala	Glu	Thr
			20					25					30		
Thr	Gln	Asp	Gln	Thr	Thr	Asn	Lys	Asn	Val	Leu	Asp	Ser	Asn	Lys	Val
		35					40					45			
Lys	Ala	Thr	Thr	Glu	Gln	Ala	Lys	Ala	Glu	Val	Lys	Asn	Pro	Thr	Gln
	50					55					60				
Asn	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	Val	Tyr	Gln	Asp	Pro	Ala	Ile	Val	Gln	Pro
65					70					75					80
Lys	Thr	Ala	Asn	Asn	Lys	Thr	Gly	Asn	Ala	Gln	Val	Ser	Gln	Lys	Val
				85					90					95	
Asp	Thr	Ala	Gln	Val	Asn	Gly	Asp	Thr	Arg	Ala	Asn	Gln	Ser	Ala	Thr
			100					105						110	
Thr	Asn	Asn	Thr	Gln	Pro	Val	Ala	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Ala	Pro
		115					120							125	
Lys	Thr	Asn	Thr	Asn	Val	Thr	Asn	Ala	Gly	Tyr	Ser	Leu	Val	Asp	Asp
	130					135					140				
Glu	Asp	Asp	Asn	Ser	Glu	Asn	Gln	Ile	Asn	Pro	Glu	Leu	Ile	Lys	Ser
145					150					155					160
Ala	Ala	Lys	Pro	Ala	Ala	Leu	Glu	Thr	Gln	Tyr	Lys	Thr	Ala	Ala	Pro
				165					170						175
Lys	Ala	Ala	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro	Lys	Ala	Lys	Thr	Glu	Ala	Thr	Pro
			180					185						190	
Lys	Val	Thr	Thr	Phe	Ser	Ala	Ser	Ala	Gln	Pro	Arg	Ser	Val	Ala	Ala
		195					200					205			
Thr	Pro	Lys	Thr	Ser	Leu	Pro	Lys	Tyr	Lys	Pro	Gln	Val	Asn	Ser	Ser
	210					215						220			
Ile	Asn	Asp	Tyr	Ile	Cys	Lys	Asn	Asn	Leu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ile	Glu
225					230					235					240
Glu	Asp	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Phe	Pro	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Arg	Asn	Gly	Val
				245					250					255	
Gly	Arg	Pro	Glu	Gly	Ile	Val	Val	His	Asp	Thr	Ala	Asn	Asp	Arg	Ser
			260					265						270	
Thr	Ile	Asn	Gly	Glu	Ile	Ser	Tyr	Met	Lys	Asn	Asn	Tyr	Gln	Asn	Ala
		275					280						285		
Phe	Val	His	Ala	Phe	Val	Asp	Gly	Asp	Arg	Ile	Ile	Glu	Thr	Ala	Pro
	290					295						300			
Thr	Asp	Tyr	Leu	Ser	Trp	Gly	Val	Gly	Ala	Val	Gly	Asn	Pro	Arg	Phe
305					310						315				320
Ile	Asn	Val	Glu	Ile	Val	His	Thr	His	Asp	Tyr	Ala	Ser	Phe	Ala	Arg
				325					330						335

ES 2 626 416 T3

Ser Met Asn Asn Tyr Ala Asp Tyr Ala Ala Thr Gln Leu Gln Tyr Tyr
340 345 350

Gly Leu Lys Pro Asp Ser Ala Glu Tyr Asp Gly Asn Gly Thr Val Trp
355 360 365

Thr His Tyr Ala Val Ser Lys Tyr Leu Gly Gly Thr Asp His Ala Asp
370 375 380

Pro His Gly Tyr Leu Arg Ser His Asn Tyr Ser Tyr Asp Gln Leu Tyr
385 390 395 400

Asp Leu Ile Asn Glu Lys Tyr Leu Ile Lys Met Gly Lys Val Ala Pro
405 410 415

Trp Gly Thr Gln Ser Thr Thr Thr Pro Thr Thr Pro Ser Lys Pro Thr
420 425 430

Thr Pro Ser Lys Pro Ser Thr Gly Lys Leu Thr Val Ala Ala Asn Asn
435 440 445

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

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

Val Ser Lys Thr Ala Thr Leu Gly Asn Gln Lys Phe Tyr Leu Val Gln
485 490 495

Asp Tyr Asn Ser Gly Asn Lys Phe Gly Trp Val Lys Glu Gly Asp Val
500 505 510

Val Tyr Asn Thr Ala Lys Ser Pro Val Asn Val Asn Gln Ser Tyr Ser
515 520 525

Ile Lys Pro Gly Thr Lys Leu Tyr Thr Val Pro Trp Gly Thr Ser Lys
530 535 540

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

Ser Lys Gln Gln Gln Ile Asp Lys Ser Ile Tyr Leu Tyr Gly Ser Val
565 570 575

Asn Gly Lys Ser Gly Trp Val Ser Lys Ala Tyr Leu Val Asp Thr Ala
580 585 590

Lys Pro Thr Pro Thr Pro Thr Pro Lys Pro Ser Thr Pro Thr Thr Asn
595 600 605

Asn Lys Leu Thr Val Ser Ser Leu Asn Gly Val Ala Gln Ile Asn Ala
610 615 620

Lys Asn Asn Gly Leu Phe Thr Thr Val Tyr Asp Lys Thr Gly Lys Pro
625 630 635 640

Thr Lys Glu Val Gln Lys Thr Phe Ala Val Thr Lys Glu Ala Ser Leu
645 650 655

ES 2 626 416 T3

Gly Gly Asn Lys Phe Tyr Leu Val Lys Asp Tyr Asn Ser Pro Thr Leu
 660 665 670
 Ile Gly Trp Val Lys Gln Gly Asp Val Ile Tyr Asn Asn Ala Lys Ser
 675 680 685
 Pro Val Asn Val Met Gln Thr Tyr Thr Val Lys Pro Gly Thr Lys Leu
 690 695 700
 Tyr Ser Val Pro Trp Gly Thr Tyr Lys Gln Glu Ala Gly Ala Val Ser
 705 710 715 720
 Gly Thr Gly Asn Gln Thr Phe Lys Ala Thr Lys Gln Gln Gln Ile Asp
 725 730 735
 Lys Ser Ile Tyr Leu Phe Gly Thr Val Asn Gly Lys Ser Gly Trp Val
 740 745 750
 Ser Lys Ala Tyr Leu Ala Val Pro Ala Ala Pro Lys Lys Ala Val Ala
 755 760 765
 Gln Pro Lys Thr Ala Val Lys Ala Tyr Thr Val Thr Lys Pro Gln Thr
 770 775 780
 Thr Gln Thr Val Ser Lys Ile Ala Gln Val Lys Pro Asn Asn Thr Gly
 785 790 795 800
 Ile Arg Ala Ser Val Tyr Glu Lys Thr Ala Lys Asn Gly Ala Lys Tyr
 805 810 815
 Ala Asp Arg Thr Phe Tyr Val Thr Lys Glu Arg Ala His Gly Asn Glu
 820 825 830
 Thr Tyr Val Leu Leu Asn Asn Thr Ser His Asn Ile Pro Leu Gly Trp
 835 840 845
 Phe Asn Val Lys Asp Leu Asn Val Gln Asn Leu Gly Lys Glu Val Lys
 850 855 860
 Thr Thr Gln Lys Tyr Thr Val Asn Lys Ser Asn Asn Gly Leu Ser Met
 865 870 875 880
 Val Pro Trp Gly Thr Lys Asn Gln Val Ile Leu Thr Gly Asn Asn Ile
 885 890 895
 Ala Gln Gly Thr Phe Asn Ala Thr Lys Gln Val Ser Val Gly Lys Asp
 900 905 910
 Val Tyr Leu Tyr Gly Thr Ile Asn Asn Arg Thr Gly Trp Val Asn Ala
 915 920 925
 Lys Asp Leu Thr Ala Pro Thr Ala Val Lys Pro Thr Thr Ser Ala Ala
 930 935 940
 Lys Asp Tyr Asn Tyr Thr Tyr Val Ile Lys Asn Gly Asn Gly Tyr Tyr
 945 950 955 960
 Tyr Val Thr Pro Asn Ser Asp Thr Ala Lys Tyr Ser Leu Lys Ala Phe
 965 970 975
 Asn Glu Gln Pro Phe Ala Val Val Lys Glu Gln Val Ile Asn Gly Gln

ES 2 626 416 T3

<400> 47

Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

5 <210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> enlazador

<400> 48

Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

15 <210> 49
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> enlazador

<400> 49

Ala Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

25 <210> 50
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia que codifica la SEQ ID NO: 49

<400> 50
gctagcgggtg gcggatcc 18

35 <210> 51
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> marcador de hexahistidina

<400> 51

His His His His His His
1 5

45 <210> 52
<211> 207
<212> PRT
50 <213> Staphylococcus aureus

<400> 52

ES 2 626 416 T3

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

<210> 53
 <211> 618
 5 <212> ADN
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 53

atggcaatga ttaagatgag tccagaggaa atcagagcaa aatcgcaatc ttacgggcaa 60
 ggttcagacc aaatccgtca aattttatct gatttaacac gtgcacaagg tgaattgca 120
 gcgaactggg aagggtcaagc ttccagccgt ttcgaagagc aattccaaca acttagtcct 180
 aaagtagaaa aatttgcaca attattagaa gaaattaaac aacaattgaa tagcactgct 240
 gatgccgttc aagaacaaga ccaacaactt tctaataatt tcggtttgca agctagcggg 300
 ggcgatccg gtggatataa aggtattaaa gcagatgggt gcaaggttga tcaagcgaaa 360
 caattagcgg caaaaacagc taaagatatt gaagcatgtc aaaagcaaac gcaacagctc 420
 gctgagtata tcgaaggtag tgattgggaa ggacagttcg ccaataagggt gaaagatgtg 480
 ttactcatta tggcaaagtt tcaagaagaa ttagtacaac cgatggctga ccatcaaaaa 540
 gcaattgata acttaagtca aaatctagcg aaatacgata cattatcaat taagcaaggg 600
 cttgataggg tgaaccca 618

10

<210> 54
 <211> 207

ES 2 626 416 T3

<212> PRT
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 54

```

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

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

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

Gly Gln Phe Ala Asn Lys Val Lys Asp Val Leu Leu Ile Met Ala Lys
                50           55           60

Phe Gln Glu Glu Leu Val Gln Pro Met Ala Asp His Gln Lys Ala Ile
65           70           75           80

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

Gln Gly Leu Asp Arg Val Asn Pro Ala Ser Gly Gly Gly Ser Met Ala
                100           105           110

Met Ile Lys Met Ser Pro Glu Glu Ile Arg Ala Lys Ser Gln Ser Tyr
                115           120           125

Gly Gln Gly Ser Asp Gln Ile Arg Gln Ile Leu Ser Asp Leu Thr Arg
                130           135           140

Ala Gln Gly Glu Ile Ala Ala Asn Trp Glu Gly Gln Ala Phe Ser Arg
145           150           155           160

Phe Glu Glu Gln Phe Gln Gln Leu Ser Pro Lys Val Glu Lys Phe Ala
                165           170           175

Gln Leu Leu Glu Glu Ile Lys Gln Gln Leu Asn Ser Thr Ala Asp Ala
                180           185           190

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

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una composición inmunogénica que comprende un polisacárido capsular de *S.aureus* de tipo 5 conjugado con una molécula de vehículo y un polisacárido capsular de *S.aureus* de tipo 8 conjugado con una molécula de vehículo, comprendiendo dicho procedimiento:
 - 5 (a) un procedimiento de purificación de polisacárido capsular de células de *S.aureus* de tipo 5 que comprende una etapa de liberación de polisacárido capsular a partir de las células mediante tratamiento de las células con ácido, en el que las células están en la forma de una pasta celular húmeda o están suspendidas en un medio acuoso, y la masa molecular del polisacárido purificado está entre 2-3500 kDa;
 - (b) conjugación del polisacárido capsular con una molécula de vehículo para preparar un conjugado; y
 - 10 (c) mezclar el conjugado con un polisacárido capsular de *S.aureus* de tipo 8 conjugado con una molécula de vehículo.
2. Un procedimiento de preparación de una composición inmunogénica que comprende un polisacárido capsular de *S.aureus* de tipo 8 conjugado con una molécula de vehículo y un polisacárido capsular de *S.aureus* de tipo 5 conjugado con una molécula de vehículo, comprendiendo dicho procedimiento:
 - 15 (a) un procedimiento de purificación de polisacárido capsular a partir de células de *S.aureus* de tipo 8 que comprende una etapa de liberación del polisacárido capsular a partir de las células mediante tratamiento con ácido de las células, en el que las células están en la forma de una pasta celular húmeda o están suspendidas en un medio acuoso, y la masa molecular del polisacárido purificado está entre 2-3500 kDa;
 - (b) conjugación del polisacárido capsular con una molécula de vehículo para preparar un conjugado; y
 - 20 (c) mezclar el conjugado con un polisacárido capsular de *S.aureus* de tipo 5 conjugado con una molécula de vehículo.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que (i) el tratamiento con ácido se lleva a cabo usando ácido acético y/o (ii) el procedimiento comprende adicionalmente una etapa de neutralización.
4. El procedimiento según cualquier reivindicación anterior, en el que el procedimiento además comprende una
 - 25 etapa de centrifugación de las células y recolección del sobrenadante que contiene polisacárido.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el procedimiento de la etapa (a) comprende adicionalmente una etapa de tratamiento del polisacárido capsular con DNasa y/o RNasa.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el procedimiento de la etapa (a) comprende adicionalmente una etapa de tratamiento del polisacárido capsular con mutanolisina.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el procedimiento de la etapa (a)
 - 30 comprende adicionalmente:
 - (a) una etapa de diafiltración;
 - (b) una etapa de cromatografía de intercambio aniónico;
 - (c) una etapa de filtración en gel; y/o
 - 35 (d) una etapa de concentración del polisacárido.
8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el procedimiento de la etapa (a)
 - comprende adicionalmente:
 - (a) una etapa de despolimerización del polisacárido purificado para formar un oligosacárido; y/o
 - (b) una etapa de filtración estéril.
9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el procedimiento de la etapa (a)
 - proporciona una composición que comprende:
 - (a) el polisacárido y un nivel de contaminación de peptidoglicano que es menor del 5 % en peso de peptidoglicano en relación con el peso total del polisacárido; y/o
 - (b) el polisacárido y un nivel de contaminación de proteína que es menor del 5 % en peso de proteína en
 - 40 relación con el peso total del polisacárido.
10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el procedimiento de la etapa (a)
 - proporciona una composición que comprende el polisacárido y un nivel de contaminación de ácido nucleico que es menor del 1 % en peso de ácido nucleico en relación con el peso total del polisacárido.
11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende adicionalmente incluir en la
 - composición uno o más antígeno(s) de proteína de *S.aureus* seleccionados del grupo que consiste en un antígeno clfA; un antígeno clfB; un antígeno sdrE2; un antígeno sdrC, un antígeno sasF; un antígeno emp; un antígeno sdrD; un antígeno spa; un antígeno esaC; un antígeno esxA; un antígeno esxB; un antígeno sta006; un antígeno isdC; un antígeno Hla; un antígeno sta011; un antígeno isdA; un antígeno isdB; y un antígeno sta073.
 - 50

FIGURA 1

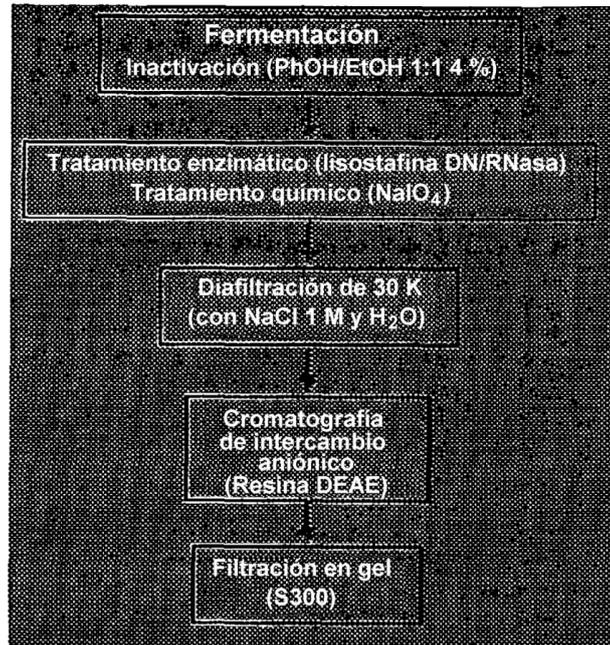


FIGURA 2

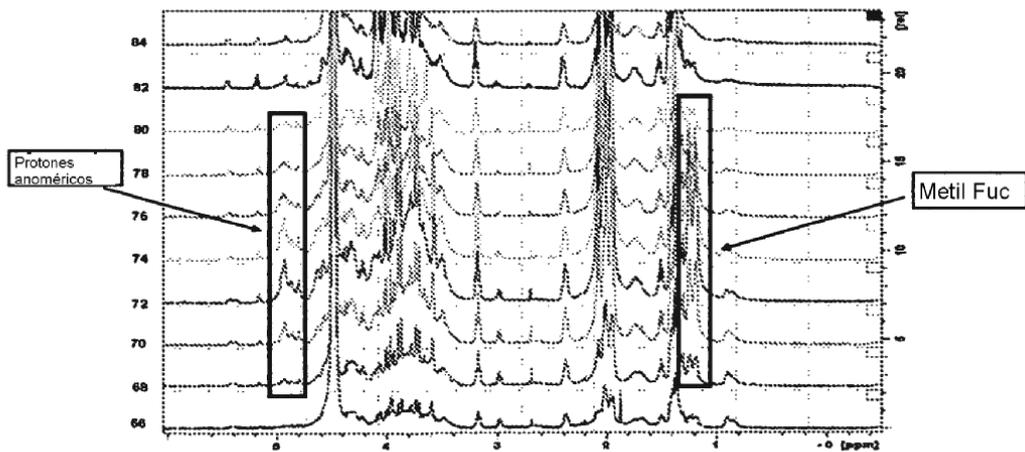
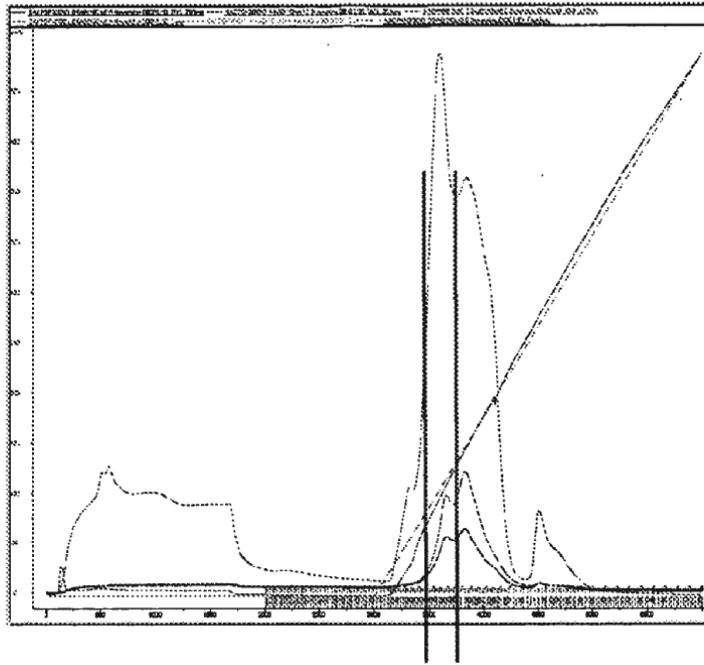


FIGURA 3

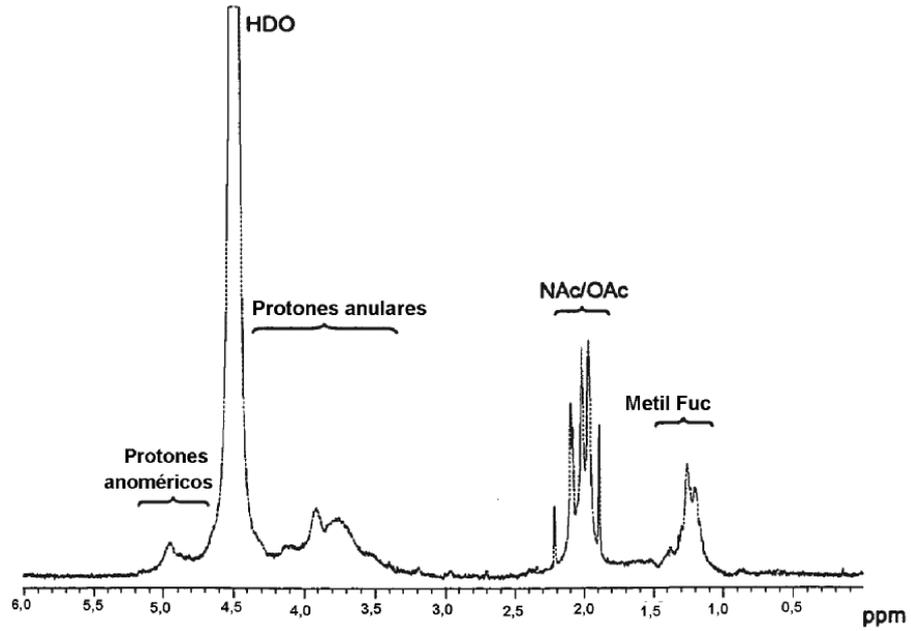
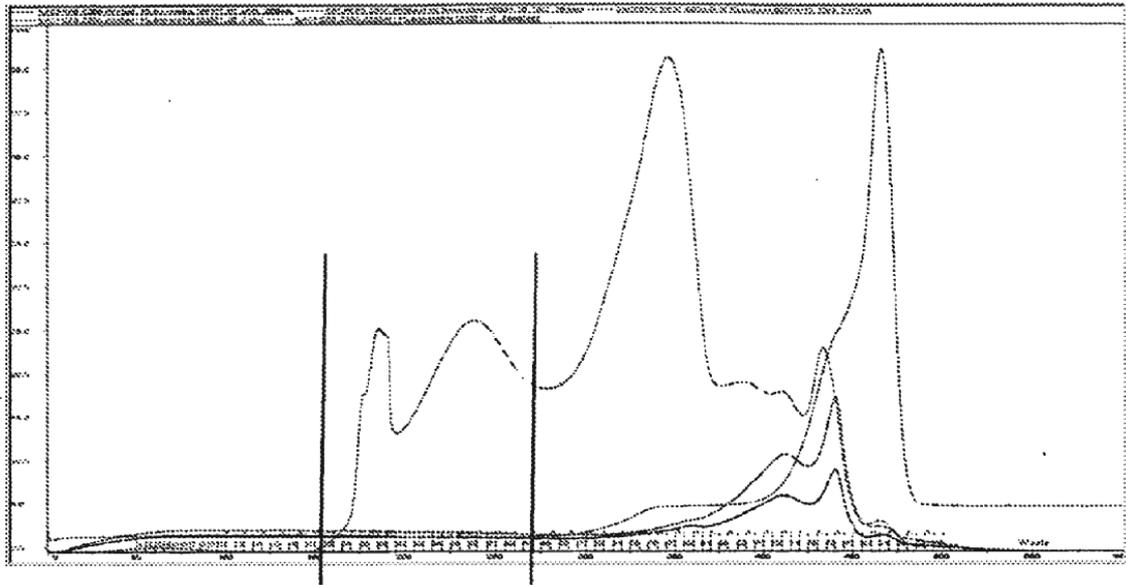


FIGURA 4

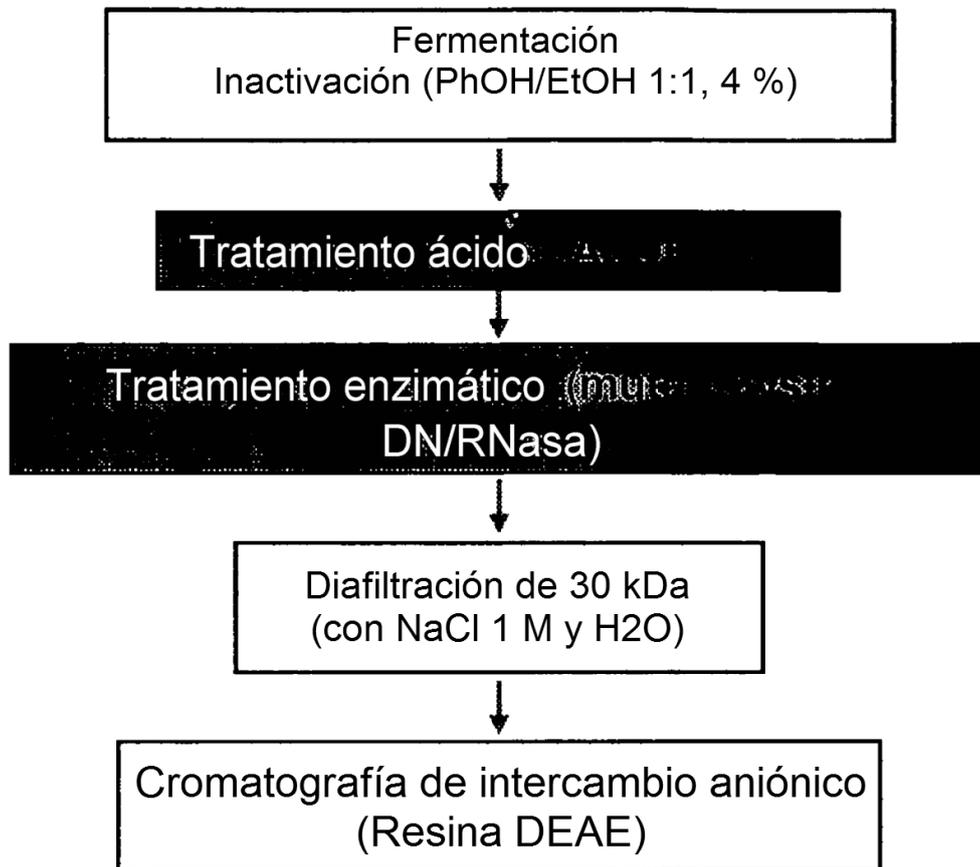


FIGURA 5

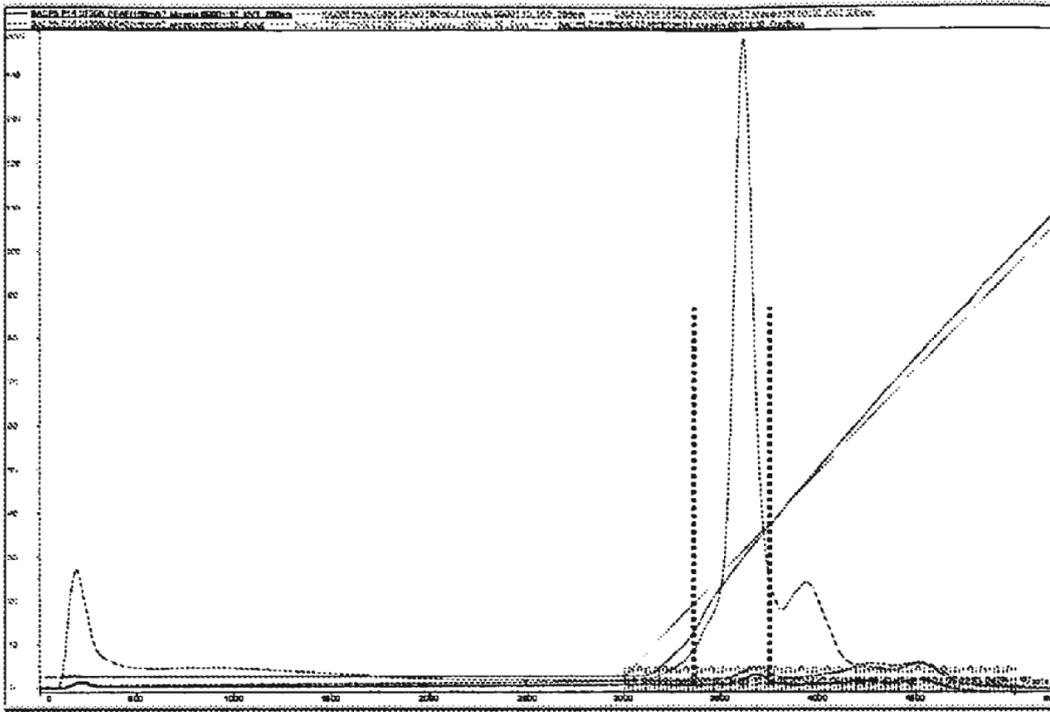


FIGURA 6

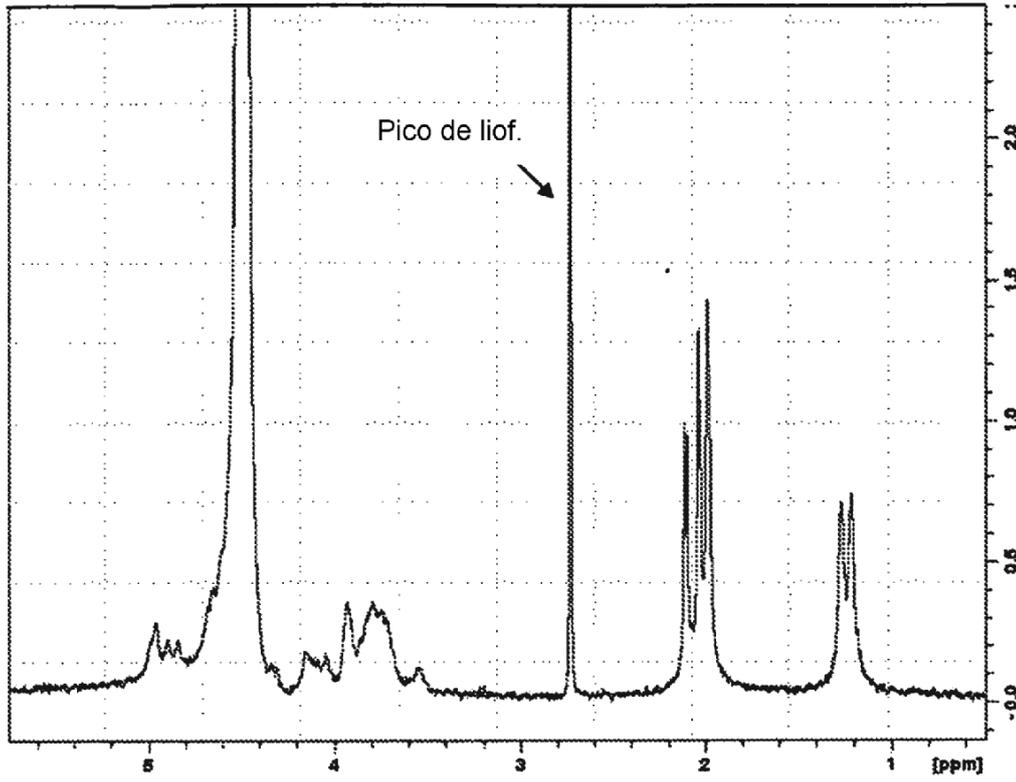


FIGURA 7

